R. PORTOCALA - L. POPA

ACIZII RIBONUCLEICI CELULARI ŞI VIRALI

EA

Scanned with OKEN Scanner

R. Portocală
Doctor-docent în științe medicale

L. Popa
Doctor în științe tehnice

ACIZII RIBONUCLEICI CELULARI ȘI VIRALI

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
1966

Scanned with OKEN Scanner

R. Portocală
Doctor-docent în științe medicale

L. Popa
Doctor în științe tehnice

ACIZII RIBONUCLEICI CELULARI ȘI VIRALI

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
1966

Scanned with OKEN Scanner

Cuvînt înainte

Dezvoltarea impetuoasă a cercetărilor biologice și medicale din ultimii ani se datorește în bună parte și aplicării în aceste domenii a biochimiei, fizicii și matematicii.

Problemele fundamentale ale biologiei, cum sînt originea vieții pe pămînt, biosinteza și multiplicarea virusurilor, transmiterea caracterelor ereditare etc., sînt astăzi abordate cu mult succes din punct de vedere biochimic. Drept consecință în limbajul biologic actual întîlnim tot mai des noțiunea de biologie și patologie moleculară, aplicate printre altele la studiile asupra acizilor nucleici virali.

Introducerea metodelor biochimice permite pe de o parte cunoașterea și aprofundarea proceselor intime ce se petrec în formațiunile biologice, iar pe de altă parte găsirea căilor celor mai potrivite pentru a modifica favorabil unele mecanisme patologice.

Dintre substanțele organice cunoscute pînă acum, acizii nucleici reține cel mai mult atenția cercetătorilor din variatele domenii ale biologiei. Faptul este motivat de rolul hotărîtor pe care acești compuși îl dețin mai ales în sinteza proteinelor și transmiterea caracterelor ereditare sau în infectivitatea inframicrobilor.

Importanța biologică a acestor compuși a crescut considerabil după cercetările comunicate în 1956 de Fraenkel-Conrat pe de o parte și de Gierer și Schramm pe de altă parte, care au demonstrat că acidul ribonucleic extras din virusul mozaicului tutunului poate induce singur infecția caracteristică virusului. Ulterior, aceste rezultate au fost confirmate de numeroși alți cercetători, care au dovedit că și alți acizi ribonucleici și acizi dezoxiribonucleici virali sînt capabili să inducă sinteza virusurilor corpusculare întregi. Menționăm că cercetările realizate de dr. R. Portocală și colaboratorii săi în Institutul de inframicrobiologie au adus o contribuție de seamă în acest

Scanned with OKEN Scanner

domeniu. Astfel s-a demonstrat pentru prima oară infectivitatea ARN din virusul gripal, ca și infectivitatea ADN din virusul APC$_3$, virusuri mari, complexe din punct de vedere morfologic și chimic.

Pe de altă parte cercetările efectuate asupra biosintezei in vitro *atît a ARN, cît și a ADN au avut drept consecință obținerea primelor date experimentale care tind să explice mecanismul sintezei proteinelor. În această direcție merită a fi amintite lucrările care au demonstrat că acizii nucleici naturali sau artificiali induc sinteza proteinelor corespunzătoare. Lucrările de această natură întreprinse azi în diferite țări au ca scop elucidarea mecanismului genetic după care se sintetizează proteinele.*

Șirul acestor exemple ar putea continua în toate domeniile de bază ale biologiei.

Monografia „Acizii ribonucleici, celulari și virali", prima de această natură din țara noastră — de doctor-docent în științe medicale Radu Portocală, șef de secție la Institutul de inframicrobiologie al Academiei Republicii Socialiste România și doctor în științe tehnice Liviu Popa, cercetător principal al aceluiași institut — își propune să prezinte cercetătorilor interesați, pe baza unei experiențe proprii de mai bine de 10 ani, atît datele devenite clasice, cît și cele mai noi realizări privind chimia și biologia acizilor ribonucleici.

O deosebită atenție s-a acordat în monografia de față, compoziției, structurii primare, secundare și terțiare a moleculelor de ARN, secvenței bazelor din interiorul lanțurilor macromoleculare. Interesul manifestat de autori față de aceste probleme se datorește faptului că proprietățile biologice ale macromoleculelor de acizi ribonucleici sînt condiționate de configurația și structura acestor compuși. Cunoscînd bine aceste proprietăți se pot aprofunda probleme de interes fundamental ca transmiterea informației genetice cu ajutorul ARN, rolul lor în sinteza și multiplicarea virusurilor și a bacteriilor etc.

O altă temă importantă din această monografie tratează despre rolul biologic al ARN. Sînt prezentate rezultatele experimentale care dovedesc rolul ARN în sinteza proteinelor, rezultatele obținute cu ajutorul ARN naturali și sintetici în domeniul descifrării codului genetic, problema infectivității ARN extrași din virusuri.

Ca anexă a acestei monografii este prezentarea celor mai utile și verificate metode de lucru folosite în cercetările asupra ARN. Astfel sînt selecționate metode de extracție, metode de analiză a ARN, metode de extracție și purificare a enzimelor ce sintetizează ARN (polinucleotid-fosforilaza, polimeraza ARN) etc.

Monografia doctorilor R. Portocală și L. Popa prezintă totodată rezultatele obținute de autori în domeniul ARN infectanți și neinfectanți, rezultate obținute în bună parte în Institutul de inframicrobiologie. În adevăr, dr. Portocală și colaboratorii săi studiază de multă vreme problema rolului acizilor nucleici în compoziția virusurilor. Cercetările efectuate în Institutul de inframicrobiologie au adus prin originalitatea lor, priorități științifice pe plan mondial.

Scanned with OKEN Scanner

Competența deosebită a autorilor în problema acizilor nucleici justifică publicarea acestei monografii, bogat ilustrată în scheme grafice, fotografii.

Prin structura ei monografia „Acizii ribonucleici" se adresează cercetătorilor din domeniul biologiei și medicinei, chimiei și fizicii.

Acestora le aduce pe lîngă rezultatele actuale de ordin teoretic, metodele practice cele mai verificate de extracție, dozare, cercetare moleculară, de verificări a infectivității etc. Îmbinarea noțiunilor teoretice cu metodele practice sporește pe de o parte valoarea intrinsecă a lucrării, iar pe de alta permite verificarea rezultatelor teoretice prin tehnicile cele mai adecvate.

★

Cunoștințele căpătate pînă în momentul actual în problema acizilor nucleici virali pot duce la interpretări și la ipoteze de lucru extrem de interesante, pe de o parte în domeniul unor viroze puțin lămurite, iar pe de altă parte în domeniul etiologiei cancerului.

În acest sens, redăm în cele ce urmează cîteva deducții ipotetice făcute într-o lucrare publicată anterior.*

Levaditi și Nicolau au arătat încă din 1922 (Ann. Inst. Pasteur, *1922, nr. 1*) *că virusul vaccinal, la animalul de experiență, produce pe piele proliferări ale celulelor epiteliale cu aspecte de început de epiteliom; această fază proliferativă a leziunilor cutanate vaccinale este însă urmată de o fază degenerativă a celulelor afectate, la care se adaugă infiltrația leucocitară, totul ducînd la pustulizarea leziunii.*

Sînt 30 de ani de cînd C.H. Andrewes (Lancet, *1934, t. I, nr. 63, p. 11*), *atrăgînd atenția asupra spectrului de acțiune al virusurilor, a arătat că acești germeni pot produce în celule degenerări și, în sfîrșit, procese proliferative.*

Au fost găsite între timp o lungă serie de tumori produse de virusuri la om și animal și în care agentul oncogen este prezent sub forma corpuscular-virală. În multe specii de tumori însă agentul viral nu a putut fi descoperit, corpusculii elementari reprezentînd agentul etiologic oncogen s-au derobat investigațiilor, iar agentul patogen tumoral a rămas încă necunoscut. Sînt oare și acestea din urmă tumori produse tot de virusuri? Această întrebare reprezintă preocuparea dominantă în cercetările asupra etiologiei cancerului.

Se știe azi că printre virusurile conținînd ADN, virusuri din grupurile variolo-vaccină, papova, adenovirusuri, pot produce tumori. Este de remarcat însă că, printre virusurile care au în structura lor ARN, cel al leucozei aviare, eminamente oncogen, se comportă ca și unele mixovirusuri care produc tumori (Lancet, *25 ian. 1964, p. 206*).

S-ar fi putut presupune că proprietățile oncogene ale virusurilor ar ține de conformația în dublă spirală a ADN; virusurile grupului papova

* Conexarea noțiunilor cunoscute în vederea unor noi interpretării și a unor noi ipoteze de lucru a fost schițată anterior în lucrarea publicată de Șt. S. Nicolau: „Se poate vorbi de infravirusuri oncogene?" (în *Omagiu lui Ștefan Gh. Nicolau*, Edit. Academiei Republicii Socialiste România, București, 1965).

Scanned with OKEN Scanner

conţin dublă spirală de acid nucleic şi sînt toate oncogene (*Andrewes*, Virology, *1963, t. 21, p. 516*). *Tot aşa, virusul polioma, cu ADN dublu spiralat* (*R. Dulbecco*, Proc. nat. Acad. Sci., Wash., *1963, t. 50, p. 878*), *şi-ar datora proprietăţile tumorigene faptului că această dispoziţie dublu spiralată ar fi şi circulară. Iar Dulbecco* (Proc. nat. Acad. Sci., Wash., *1963, t. 50, p. 236*) *crede că aranjamentul circular al ADN dublu spiralat ar fi o proprietate comună virusurilor tumorale.*

În aceste conformaţii speciale, ADN viral ar fi suficient de stabil pentru a putea fi încorporat în aparatul genetic celular.

Faţă de corpusculul viral oncogenic, acidul său nucleic este o fracţiune *componentă, o porţiune din virus, un* artrovirus, *agent patogen necesar şi suficient pentru a determina apariţia tumorii.*

Artrovirusul oncogen — adică fracţiunea acid-nucleică indispensabilă biogenezei virale intracelulare care înfăptuieşte înmulţirea germenilor virali — poate fi modificat în celulă în cursul proceselor de biosinteză. Secvenţele de componenţi înşiruite în spiralele de acizi nucleici virali pot fi modificate în succesiunea lor, în numărul componentelor dintr-o anumită secvenţă, modificări imprimate în primul rînd de specificul embriogenetic, şi anume de complexul morfologic genetic al celulei în care pătrunde agentul patogen oncogen, artrovirusul-nucleinic.*

Aceste modificări exercitate asupra acidului nucleic viral provenit din germenul polioma explică de ce unul şi acelaşi virus produce variate tumori la diverse specii animale la care este inoculat. Tot în acelaşi mod s-ar interpreta unele dintre rezultatele inoculărilor cu virus leucemic.

Interpretările noastre ne fac să coborîm din ce în ce mai jos, pe primele trepte ale scării taxonomice a vieţii, trepte coborîte succesive de savanţi şi filozofi din toate timpurile, de la micile mamifere născute „spontan" din cîrpe vechi şi graminee (şoarecii lui Von Helmont), la insectele născute „spontan" în diverse moduri (viespile şi scarabeii lui Ross născute din balega de vaci, albinele ieşite prin coarnele tăiate ale capului de taur îngropat), la protozoarele şi microbii apăruţi spontan în carnea putredă (Needham, Ponchet şi Hoblot), pînă la virusurile apărute din transformarea unor gene celulare (1937).

Dacă nu se mai discută problema apariţiei spontane a mamiferelor, insectelor, protozoarelor şi a microbilor, problemă definitiv încheiată, în schimb

---

* Acizii dezoxiribonucleici — virali sau nevirali — sînt constituiţi din lanţuri de *nucleotizide* în structura cărora intră *dezoxiriboza*, de care se leagă *baze purinice* (adenină, guanină) sau *pirimidinice* (timină, citozină). Diferenţa dintre un acid dezoxiribonucleic şi un altul este determinată de numărul şi de secvenţa celor patru baze sus-menţionate (adenină, guanină, timină şi citozină).

În schimb, acizii ribonucleici — virali sau nevirali — au *riboză* în locul dezoxiribozei, iar în locul timinei au uracil. Schimbări cantitative în cele patru baze purino-pirimidinice, ca şi ordinea secvenţei lor, imprimă specificitatea acidului ribonucleic.

Rezultă că modificări în numărul moleculelor de baze purinice ori pirimidinice, în secvenţa acestor molecule, deci în structura macromoleculei acidului nucleic aduc schimbări în proprietăţile specifice ale acidului nucleic, mai evidente în special atunci cînd aceste proprietăţi sînt considerate — la acizii nucleici virali — din punctul de vedere al patogenităţii.

Scanned with OKEN Scanner

povestea *inframicrobilor, a virusurilor este mai puţin bine delimitată; acest grup este constituit din germeni infecţioşi mai puţin complecşi ca structură, mai simpli, mai primitivi în organizarea lor decît microbii. În acest grup plasăm — mereu coborînd pe scara taxonomică — rickettsiile, pararickettsiile şi virusurile. Contrar părerilor eronate ale lui Ch. Nicolle, Boşian şi alţii, virusurile nu sînt* fracţiuni de microbi (*artromicrobi*) *capabile să se reconstituie în forma iniţial microbiană; la rîndul lor, microbii nu se pot transforma în virusuri. Virusurile deci nu sînt* artromicrobi, *ci, prin structura lor aparte, prin autonomia lor în scara taxonomică a vieţii şi prin structura lor simplă submicrobiană, sînt* inframicrobi.

Se ştie că în ultimii ani s-a dovedit că pentru a obţine o infecţie virală — in vivo *sau* in vitro — *nu este indispensabilă infectarea organismului sau a celulei sensibile cu „virionul" (Lwoff), adică cu virusul „întreg", cu corpusculul elementar viral constituit din toate componentele lui. Acidul nucleic viral, „nucleoidul" lui Lwoff, în stare cvasipură, debarasat aproape total de proteine — la virusuri mari despărţit de proteinele virale, de lipide şi de glucide — debarasat deci de capsomerii şi de capsida lui Lwoff, poate da infecţia, celula sensibilă sintetizînd un acid nucleic identic celui viral pătruns în sînul ei; într-o altă fază, noul acid nucleic viral sintetizat de celulă este echipat cu proteina specifică şi cu celelalte elemente care definesc specia virusului iniţial din care fusese extras acidul nucleic care a fost introdus în celulele sensibile. Aşadar infecţia poate fi generată de pătrunderea acidului nucleic viral în celulă.*

Noi ştim că bolile infecţioase pot fi produse de microbi şi de inframicrobi (printre care foarte importante sînt virusurile).

Există însă anumite „viroze" din care a fost imposibil pînă în prezent să se izoleze virusul, corpusculul elementar *etiologic. În aceste cazuri nu ar putea fi vorba de infecţii provocate de acizi nucleici „virali" care s-ar fi autonomizat sub forma lor macromoleculară, fără să mai ajungă să determine „virioni" întregi în celulele biosintetizante de corpusculi elementari? Iar dacă infecţia provocată de acidul nucleic viral este o infecţie provocată de un „artrovirus" reversibil care este reconstituit în celulă sub forma întreagă de virus, în cazul infecţiei provocate exclusiv numai de forma macromoleculară a acestui acid nucleic infecţios ireversibil, incapabil să inducă celula la sinteza germenului corpuscular virotic, se poate vorbi de o infecţie dată de* „infravirus"?

★

Sînt cîteva săptămîni de cînd, între scrisorile primite din toată lumea am găsit o scrisoare ce mi-era adresată de un cercetător sovietic din Kiev, dr. S. Şerban. Între altele, distinsul meu corespondent îmi punea două întrebări: prima, de ce întrebuinţez termenul „inframicrobiologie" şi nu cel de „virusologie"; a doua era formulată în modul următor: „ce ne-am face dacă virusologii ar descoperi ceva şi mai mic decît virusurile? Da, aşa ceva este posibil

de așteptat. Pe urmă va trebui să zicem „ultrainframicrobiologie". Nu va fi prea neîndemînatic de pronunțat?"

La prima întrebare, i-am răspuns bineînțeles că toate virusurile sînt inframicrobi, submicrobi, elemente infecțioase taxonomic inferioare microbilor; nu însă toți inframicrobii sînt virusuri, exemplu rickettsiile și pararickettsiile care nu sînt nici virusuri și nici microbi, ci germeni inframicrobieni, submicrobieni ca structură, însă superiori virusurilor în complexitatea lor biologică și structurală. Nu pot fi confundate rickettsiile nici cu microbii și nici cu virusurile.

Privitor la a doua întrebare, i-am răspuns colegului dr. Șerban că, în momentul cînd îmi scria, el nu bănuia cît de aproape era de adevăr. Oare agentul patogen „acid nucleic viral" este el însuși un „virus"? Cert este că virusul are altă structură și multe alte însușiri pe care acidul nucleic activ-virulent nu le are. „Ce ne-am face dacă virusologii ar descoperi „ceva" mai mic decît virusurile"? Dar, i-am răspuns, „așa ceva" este chiar descoperit! Este vorba de unitățile moleculare infecțioase, de moleculele infectante de acid ribonucleic sau dezoxiribonucleic.

Așa cum o spusesem cu un an înainte de a primi scrisoarea sus-menționată (vol. Omagiu lui Șt. Gh. Nicolau) cred că în unele cazuri este vorba de „artrovirusuri" în concepția de fragment de germen a lui Charles Nicolle: această fragmentare s-ar produce atunci cînd molecula de acid nucleic viral introdusă în celulă se retransformă — în cursul proceselor de biosinteză celulară — în virusul propriu-zis, în virionul căruia aparținuse acidul nucleic.

În alte cazuri, agentul patogen viral, corpusculul elementar, degradat în organism, poate subzista în celule numai sub forma de moleculă virulentă de acid nucleic, integrată sau nu în genomul celular, și este generat ca atare de biosinteza celulară, fără să se mai matureze și să ajungă astfel la stadiul de virion. Este vorba în acest caz de un infravirus.

Iată deci că s-a găsit și ceea ce colegul sovietic Șerban presimțise că este posibil să se descopere „ceva mai mic decît virusurile". Nu este necesar să complicăm cuvintele pînă la „ultra infravirus" cum se teme el că se va face; și nu cuvîntul complicat artificial construit ar putea împiedica realitatea, existența agentului patogen subviral, a acidului nucleic viral patogen, a infravirusului. Și tot așa cum, alături de Levaditi, în 1920 — 1927, am aflat că mă găseam la începutul structurării unei științe noi, a inframicrobiologiei, după aproape 50 de ani am senzația că mă găsesc în zorile structurării unei alte științe noi, infravirologia.

Coborînd scara taxonomică a vieții, savanții și filozofii aveau încă piciorul solid ancorat în noțiunea de „viață" atunci cînd ajunseseră la treapta „microb". La treapta „inframicrob", și în special la cea de „virus", părerile erau împărțite: virusul „trăiește"? Este el o formă de viață? Ca să se răspundă afirmativ s-a invocat multiplicarea lui, dar mai ales adaptabilitatea lui. Însă, ulterior s-a dovedit că multiplicarea virusului este diferită de ceea ce concepția pastoriană dovedise pentru microbi: nu virusul se multiplică, ci celula în care el pătrunde îl sintetizează. Iar „adaptabilitatea" lui nu re-

prezintă decît modificările ce i le imprimă celula ce-l sintetizează, ea creînd aspecte noi în germenul viral fabricat pe modelul acidului nucleic viral declanșînd biosinteza virionului în celulă.

Cînd însă un acid nucleic inert, *în contact cu un acid nucleic viral activ și în prezența unor enzime, devine* și el *activ, deci poate declanșa în celulă biosinteza virionilor, se mai poate oare vorbi despre „viața" acestei substanțe chimice, inițial cu totul inerte?*

Iată că problema începuturilor „vieții" este încă departe de a fi rezolvată; ba mai mult, lipsa unei definiri adecvate — față de noile noțiuni științifice acumulate recent — împiedică tranșarea unor probleme capitale din domeniul virusurilor și al elementelor patogene subvirale (acizi nucleici activi) ce ne conduc în lumea infravirusurilor.

Oricum ar fi, să vedem cum ne pot ajuta noile date relative la acizii nucleici virali să ne explicăm geneza tumorală precum și particularitățile neînțelese ale unor anumite viroze.

Tumori

Ca și în bolile infecțioase, în domeniul etiologiei tumorilor cunoaștem tumori provocate de: a) microbi (b. tumefaciens); *b)* virusuri (*sarcomul găinilor lui Rous, mixomul lui Sanarelli la iepure, tumoarea lui Shope la iepurele sălbatic,* Moluscum contagiosum *la om etc.*). *În primele, microbii sînt evidenți, cultivabili în medii de cultură comune. În grupul al doilea sînt tumori în care orice începător în ale virusologiei poate dovedi prezența corpusculilor elementari virotici.*

c) Mai sînt însă tumori în etiologia cărora nu s-au putut descoperi nici microbi nici virusuri. Nu e mai puțin adevărat că structura acestor tumori, evoluția lor, biologia lor sînt întrutotul asemănătoare cu cele ale tumorilor virale, minus corpusculii elementari.

Un exemplu frumos ni-l dă tumoarea lui Shope. La iepurele sălbatic, imaginile microscopice arată evidența etiologiei virale prin multitudinea corpusculilor elementari în țesutul patologic. Trecută la iepurele de casă, această tumoare evoluează cu absența totală de corpusculi elementari virotici. Și totuși tumoarea este generată de virusul tumorigen! Probabil că în cazul de față ceea ce s-a numit „virus mascat" nu e altceva decît o parte din componența virală, și anume acidul nucleic infecțios viral. Nici o cultură artificială, cît de abilă și rafinată tehnic, nu a putut restitui pînă în prezent acestui acid nucleic viral și tumorigen, acestui „artrovirus", forma de virus total.

Pasajul tumorii experimentale a iepurelui de casă prin suspensie tumorală la iepure de casă nu este posibil; iar la iepurele sălbatic este posibil numai prin grefă. Tumoarea provenită dintr-o grefă luată de la iepurele domestic, provocată la iepurele sălbatic nu are corpusculii elementari și nu este inoculabilă în serie prin suspensii de tumoare, ci numai prin grefă la această din urmă specie animală. Agentul infecțios corpuscular, viral, transformat,

Scanned with OKEN Scanner

pare a-şi fi simplificat astfel structura sa, debarasîndu-se în foarte mare parte de echipamentul proteinic, de capsomeri şi capsidă.*

Ansamblul acestor experienţe, interpretate în lumina noilor date obţinute în domeniul multiplicării virusurilor prin acizii lor nucleici, ar pleda pentru transformarea ireversibilă a agentului viral corpuscular (corpuscul elementar) în agent viral macromolecular : agentul infecţios corpuscular, în circumstanţe determinate, se poate astfel modifica, simplifica şi transforma în agent infecţios molecular (acid nucleic viral).

În aceste circumstanţe se poate vorbi despre corpusculi elementari infecţioşi (virus) *şi de elemente infecţioase macromoleculare* (infravirus).

Formele de infravirus *macromolecular sînt ele ireversibile în forme corpusculare de* virus? *Experienţele de mai sus, făcute cu agentul cauzal al papilomului lui Shope, par să pledeze în acest sens. Totuşi, alte cercetări s-ar opune acestei păreri.*

Nu e mai puţin adevărat însă că tumori ca sarcomul sau epiteliomul şoarecelui şi al şobolanului, precum şi alte multe tumori ale omului şi animalelor, se comportă ca tumori provocate de infravirusuri, *adică de elemente patogene macromoleculare, de acizi nucleici virali* stabilizaţi ca atare şi nereversibili *în forma primitivă ipotetic corpusculară, de* virus. *Macromoleculele de acid viral,* autonomizate, *ar deveni infravirus.*

Lăsînd la o parte tumorile provocate de microbi (realitate incontestabilă), precum şi cele cu etiologie virală (altă realitate incontestabilă), se poate lua în considerare ipoteza etiologiei infravirale a celorlalte tumori de natură încă nedefinită.

Agentul oncogen, în aceste cazuri, ar fi infravirusul molecular, acidul nucleic infecţios, stabilizat sub această formă ; celula capabilă să-l sintetizeze practic întotdeauna identic lui însuşi, după matriţa pe care el o reprezintă în elementul citologic în care el a pătruns, asigură astfel multiplicarea agentului patogen macromolecular. Şi infecţia progresează în continuare sau regresează la un moment dat, după proprietăţile caracteristice ale agentului infecţios care poate provoca tumori maligne sau tumori benigne.

Infravirusurile *oncogene, molecule infecţioase de „nucleoid" viral, dezgolite de carapacea proteică ce caracterizează* virusurile, *ar reprezenta, faţă de microbi, rickettsii, pararickettsii şi virusuri, o treaptă inferioară a scării taxonomice a vieţii — dacă de viaţă se mai poate vorbi la aceşti*

* Este ştiut că tumorile virale sînt antigenice. Agentul etiologic, germenul viral corpuscular, fiind echipat cu proteinele corespunzătoare fiecărui virus în parte, iar aceste proteine fiind antigenice, inocularea tumorii totale sau a corpusculilor virali oncogeni izolaţi din aceste tumori provoacă anticorpi la animalul de experienţă, provoacă imunitate.

Acidul nucleic viral, „nucleoidul", prin el însuşi nu este antigenic. Inocularea sa la un animal insensibil faţă de germenul viral din care acidul a fost extras nu provoacă anticorpi. Inocularea la animale receptive a tumorilor în etiologia cărora nu există corpusculi elementari virali — a tumorilor de tipul sarcom sau epiteliom al şoarecelui sau al şobolanului — nu provoacă anticorpi antitumorali, nu provoacă imunitate. Acidul nucleic intraviral din aceste tumori, ca şi orice acid nucleic neantigenic, nu provoacă anticorpi, nu dă imunitate. Acest fapt, în vederile noastre, constituie încă un argument în favoarea posibilităţii etiologiei infravirale a tumorilor neprovocate de virusuri corpusculare.

Scanned with OKEN Scanner

agenți patogeni moleculari. Totuși, prizonieri ai definițiilor date pînă în prezent vieții, în posesia datelor științifice actuale, care nu ne permit să tragem o linie de demarcare între activitatea și proprietățile elementelor pe care le numim infravirusuri (acizi nucleici infecțioși stabilizați) și acizii nucleici virali reversibili, nici între aceștia și corpusculii elementari virali propriu-ziși, pararickettsii și rickettsii, constatăm fapte și date noi, care ne pun în nedumerire. Vorbim, stingheriți de lipsa unui vocabular adecvat realităților, de molecule de acid nucleic „viu" sau „mort"; sau, atenuînd impropriul acestor exprimări, în loc de „viu" și „mort" spunem „activ" și „inactiv". Trecînd la virusuri, asistăm la controversa inițiată o dată cu structurarea virusologiei. Virusurile erau pe vremuri considerate „moarte": toxine, enzime etc. S-a dovedit că sînt „vii" fiindcă sînt corpusculare, cu structură inframicrobiană, elemente care au atributul vieții — adaptabilitatea la mediu. Dar a apărut descoperirea multiplicării virusului, care s-ar face — după unii autori — exclusiv prin biosinteză: nu virusul se înmulțește, ci celula îl sintetizează ca atare, îl fabrică, cum poate fabrica și alte substanțe inerte. Iată de ce virusul nu ar fi „viu". Cred însă că această biosinteză virală realizată de celulă este numai una dintre modalitățile mulțumită cărora asistăm la multiplicarea germenilor virali, alta fiind sciziparitatea, modalitate imposibil de negat la anumite virusuri. Dar între calificativele de „viu" și „mort", nu s-ar pune astfel decît bariera șubredă a sciziparității? Este inadmisibil.

Or, dacă scapă . . . . cu „viață" din grupul virusurilor, trebuie să recunoaștem aceleași calități de „viață" la acizii lor nucleici infecțioși, precum și la infravirusurile oncogene. Este totuși prea mult să încercăm să distingem molecule „vii"! A venit momentul, în cunoașterea noastră, cînd apare absolut indispensabil să ne creăm un vocabular mai corespunzător cunoștințelor și cînd fenomenul „viață" trebuie definit în mod mai satisfăcător.

Plasticitatea virusurilor, elemente submicrobiene în scara vieții, mai simplu și mai primitiv organizate decît microbii, este mare. Cunoaștem variabilitatea în natură, ca și variabilitatea dirijată la care pot fi supuse aceste inframicroorganisme.

Infravirusurile oncogene, molecule infecțioase de acid nucleic stabilizate ca atare, dezbrăcate de învelișuri proteice, debarasate de constituenții capsomerici-capsidiali, au în comportarea lor o plasticitate încă mai accentuată, și aceasta în funcție de organizarea lor moleculară.

Chiar și rezistența acestor elemente infecțioase apare diminuată uneori față de cea a virusurilor.

Ultrapresiunea la 1 800 de atmosfere inactivează total (omoară) celula normală, ca și pe cea canceroasă. Or, virusurile încep să fie inactivate la presiuni ce depășesc 3 000 de atmosfere. Este unul dintre argumentele care excludea acum 25 de ani ipoteza virală a cancerului. Explicarea sensibilității egale față de ultrapresiune a celulei normale și a celei canceroase ar rezida în faptul că infravirusul tumorigen, adică „molecula infecțioasă lipsită de învelișuri proteice", are o vulnerabilitate mult mai mare decît virusul

Scanned with OKEN Scanner

corpuscular față de presiunile mari. Experiențe făcute cu acizi nucleici infecțioși izolați din virusuri pot confirma acest fapt.

În scara biologică descendentă a agenților infecțioși, între microbi și pararickettsii se plasează rickettsiile, germeni cu unele caractere de microb și altele de germeni inframicrobieni. Între rickettsii și virusuri există grupul pararickettsian de tranziție, iar între virusuri și infravirusuri par să existe elemente infecțioase cu duble calități, aparținînd printr-unele proprietăți grupului viral, printr-altele celui infraviral.

Nu mai amănunțesc datele privitoare la polioma, la virusul leucemogen (care poate provoca uneori tumori evidente la animal), la germenul pararickettsian cultivat de 15 ori din diverse cazuri umane de boala lui Hodgkin (Cajal și colab.), și care însumează posibilitățile de procese cînd virale, cînd infravirale. În aceste cazuri ar apărea posibilitatea reversibilității în ambele sensuri a agentului viral și infraviral.

Tot ca o posibilitate cu mari probabilități este dăinuirea în organism timp mai mult sau mai puțin îndelungat, sub forma de infravirus, a unor agenți patogeni inframicrobieni.

Credem că mulți și diferiți inframicrobi pot subzista în organismul uman chiar și zeci de ani sub formă de „artrovirus", sub formă deci de acid nucleic infecțios, găzduit, adăpostit, mascat în anumite celule sub diferite carapace proteice care îl pot scoate temporar din circulație, îl pun în afara economiei active a organismului. Cauze fortuite, reprezentate prin diverși factori adjuvanți slăbind rezistența locală sau generală a organismului (traumatisme, intoxicații, iradiații, anumite boli, dereglări metabolice, hormonale etc.), pot pune celula-gazdă în starea de a-și schimba activitatea sa normală în favoarea acidului nucleic viral găzduit și biosinteza infravirală, sau chiar virală, se se poate dezlănțui, cu urmările patologice corespunzătoare — virozâ, tumoare etc. — în funcție de agentul infecțios molecular sălășluit în sînul ei.

În acest mod se poate concepe și apariția cancerului, al cărui agent patogen infraviral, constituit din acid nucleic infecțios, poate sălășlui inactiv timp îndelungat în anumite celule ale organismului și în urma acțiunii unor cauze adjuvante — al căror număr este vast — poate fi activat, poate fi „demascat", poate fi reprodus continuu și progresiv de celula care îl găzduiește și de congenerele ei în care el poate pătrunde. Transformarea din precancer în cancer nu ar fi astfel decît o intensificare în biosinteza acidului nucleic oncogen, în sînul celulelor în care el pătrunde progresiv.

În ultimă instanță, celula tumorală nu ar fi decît celula în care acidul nucleic oncogen ar tulbura aparatul genetic și, prin prezența sa, i-ar provoca o totală schimbare a funcțiilor normale, schimbare dominată de biosinteza intracelulară a infravirusului molecular, a însuși acidului nucleic tumorigen.

Din toate aceste considerații, sintetizate în urma datelor noi privind acizii nucleici infecțioși de origine virală, ar reieși ipoteza existenței unui nou grup de agenți patogeni, infravirali, *constituiți din molecule infecțioase de acizi nucleici. Individualizate ca atare, aceste infravirusuri ar fi răspunzătoare de producerea tumorilor în care nu pot fi găsiți ca agenți etiologici*

Scanned with OKEN Scanner

nici microbi și nici inframicrobi virali corpusculari din grupul virusurilor propriu-zise.

Inframicrobioze (rickettsioze, pararickettsioze, viroze)

Într-o serie de boli inframicrobiene elemente necunoscute pînă azi, pot fi interpretate în lumina cunoștințelor căpătate în domeniul acizilor nucleici activi, patogeni.

Encefalita lui von Economo, *numită încă și encefalita letargică, este cu siguranță o viroză, al cărei aspect clinic s-a schimbat în decursul vremei. Între anii 1918 — 1922 se întîlneau cazuri clinice frecvente de encefalită letargică dintre care unele — destul de rare — se terminau letal, altele — cele mai multe — se vindecau în mod definitiv, fără sechele. A intervenit o perioadă în care, în multe cazuri, consecutiv encefalitei acute, apărea parkinsonul postencefalitic. Ulterior cazurile de encefalită von Economo clinice s-au rărit pînă la dispariție; în schimb, în urma unor ușoare sindroame pseudogripale, sau chiar în absența totală a acestor schițări de stare patologică — au apărut cazuri de parkinsonism „postencefalitic" fără encefalită prealabilă. Bolnavul parkinsonian din această din urmă categorie face o boală lungă, trenantă, care se agravează progresiv și care duce în mod inexorabil la moarte. Agentul ei cauzal — din domeniul virusurilor* — nu reușește să imunizeze organismul, *deci boala nu se mai oprește, nu se vindecă, durata ei putînd ajunge la 5 — 10 — 20 de ani cu sfîrșit totdeauna letal. Sînt de părere că virusul* corpuscular (*niciodată identificat*) *al bolii, în epoca incipientă a ei (1918 — 1922) reușea să imunizeze organismul, bolnavii se vindecau prin imunizarea activă ce se producea în organism. Cu timpul, virusul s-a modificat, a îmbrăcat o formă neimunizantă (probabil forma de acid nucleic individualizat și necapsidat); lipsit în compoziția sa de capsida proteică imunizantă, agentul patogen continuă să fie reprodus în celulă sub formă de acid nucleic infectant fără ca această reproducere să poată fi oprită de procesul de imunizare tisulară, proces care condiționează vindecarea.*

Parkinsonianul encefalitic poate contamina mediul în care trăiește. S-au descris la Spitalul Salpétrière din Paris asemenea cazuri de contaminare. Cunosc de asemenea o experiență nepublicată în care un cercetător a inoculat intrarachidian doi nebuni cu lichid cefalorachidian provenit de la un asemenea parkinsonian: ambii indivizi inoculați au murit de encefalită. Însă nici de la parkinsonienii sus-amintiți nu s-a putut izola nicicînd un virus corpuscular. Totul ne face să presupunem că agentul etiologic — în aceste cazuri — este sub formă moleculară de acid nucleic infecțios, sub formă deci de „infravirus".

Hepatita epidemică

Un alt exemplu ar fi cel pe care ni-l prezintă în momentul actual hepatita epidemică. *Să recapitulăm cîteva date cunoscute.*

În 1943 împreună cu Portocală și Moțoc, am comunicat rezultate obținute în transmisia bolii la animale de experiență, precum și date noi de morfopatologie. Printre acestea din urmă, semnalăm incluziile găsite în ficatul omului bolnav (puncția) și în organele animalului inoculat experimental. O serie de cercetători au confirmat curînd aceste date. Investigații minuțioase de incluziogeneză în hepatita epidemică mi-au permis să descriu — în 1943 — 1944 — în nucleul celulelor hepatice, aglomerări de corpusculi elementari virali pe cale de a constitui incluzii, aspecte asemănătoare celor ce descrisesem altădată în herpes, varicelă, zonă etc.

În perioada cînd am realizat aceste cercetări, virusul primitiv hepatitogen putea fi izolat ușor prin însămînțare în oul de găină embrionat. Virusul astfel izolat era hemaglutinant. Purificat prin centrifugare fracționată și colorat pe frotiu cu isamină *sau pe secțiuni cu* albastru de metil-oxalatat-fuxină *(metodele lui Nicolau sau Nicolau și Kopciowska) virusul apărea corpuscular, cu dimensia controlată la microscopul electronic de 80 — 90 mμ. L-am numit virusul hepatitei Botkin.*

Ulterior (1950) a apărut și am descris în hepatita epidemică o nouă variantă de virus care provoca hepatita sclerogenă, formă de boală practic absentă în marile epidemii din țara noastră, din 1917 și din 1942. Virusul acestei forme noi de hepatită se lăsa ușor cultivat în oul embrionat, era tot hemaglutinant fără să dea hemaglutinare încrucișată cu virusul primitiv al hepatitei Botkin, și nu producea incluzii în nucleul celulei hepatice.

Numeroși autori au confirmat între timp toate aceste date, de la prezența incluziilor și transmisibilitatea bolii inaparente la animale de experiență, pînă la cultivabilitatea virusului în oul embrionat și hemaglutinabilitatea lui etc.

Însă transformarea bolii și inclusiv a virusului hepatitic a continuat : în 1955 virusul nu mai dădea fenomenul de hemaglutinare ; apoi, el nu s-a mai lăsat cultivat, în aceleași condiții și de aceiași autori care-l cultivaseră de nenumărate ori, adesea în lungi serii. Lucrările ce au apărut după această dată erau cu totul contradictorii, fie între ele, fie față de lucrările anterioare. Confuzia a devenit la un moment dat atît de mare, încît la Congresul al II-lea de patologie infecțioasă (Milano, 1959) s-a pretins că sutele de lucrări apărute în lume asupra virusului hepatitic sînt eronate.

Am dovedit că lucrările incriminate erau toate juste, dacă se lua în considerare momentul apariției lor. Ele se refereau la un anumit moment din dinamica transformării virusului hepatitic în natură. *Variabilitatea naturală a germenului făcea ca lucrările din 1958 să înscrie rezultate diferite de cele obținute în 1942, 1944, 1948 sau 1950.*

Documentele aduse la acel congres de școala românească de inframicrobiologie au dovedit că nu cercetătorii din toată lumea s-au înșelat în experiențele lor, ci proprietățile virusului cu care ei au lucrat se schimbaseră treptat în decursul anilor precum și boala pe care el o produce.

Un fapt esențial: de unde hepatita din 1917 ca și cea din 1942 era o boală ușoară, de scurtă durată, cu infimă mortalitate, imunizantă, fără sechele, cea de mult mai tîrziu a devenit uneori gravă (epidemii cu mortalitate

Scanned with OKEN Scanner

de peste 37%) adesea trenantă sau recidivantă, deci, în aceste cazuri, neimunizantă. Ba mai mult, izolarea virusului a devenit quasi imposibilă; cele cîteva tulpini de virus izolate în ultimii ani în U.R.S.S., R.S. Cehoslovacă, Republica Socialistă România, S.U.A. etc., sînt, după expresia savantei Șubladze, candidați ipotetici la titlul de agenți etiologici ai hepatitei.

Cred că în cazurile de hepatită recidivantă sau trenantă și în care, din lipsă de imunizare a organismului, nu există vindecare ci moarte prin atrofie hepatică, virusul hepatitic, decapsidat — deci neantigenic — este multiplicat în celulele organismului ca atare (sub formă de infravirus molecular, de acid nucleic infecțios), iar nu sub formă de virion capsidat și imunogen. Iată o transformare a virusului, care se aseamănă în parte cu cea încercată de agentul etiologic al encefalitei letargice.

Bineînțeles, că unul din factorii esențiali care regizează aceste transformări în natură este o anumită stare de rezistență a organismului, imunitate parțială a colectivității în contact frecvent cu virusul-antigen. Legile, însă, care conduc la aceste transformări nu sînt încă lămurite în complexul lor. Iar raportul între formele virale și infravirale dintr-o boală dată, ar condiționa și alura și pronosticul ei.

Psoriazisul, reumatismul infecțios, endocardida latentă *etc. ar fi încă viroze în care analiza rolului agentului patogen infraviral ar lămuri durabilitatea bolii.*

În herpesul recidivant, *așa cum am arătat împreună cu Poincloux încă din 1923—1927, iar cu Portocală mai tîrziu (1939—1941), între două recidive, virusul „doarme" în ganglionul spinal al regiunii interesate. Cauze adjuvante din care cea mai frecventă este cea sezonieră, îl „trezește" din „adormire" și erupția recidivantă apare. În lucrări mai recente împreună cu Portocală și Balmuș, am transformat virusul herpetic recidivant în virus de herpes simplex,* cultivîndu-l in vivo într-un mediu foarte prielnic. *Este de crezut că germenul herpetic „adormit" între 2 recidive este în realitate sub formă de infravirus necapsidat, neimunogen. Cauzele adjuvante ce-l „trezesc" nu sînt decît condițiile optime de biosintetizare luxuriantă în celulă și sub formă de virion imunogen.*

În domeniul rickettsiozelor, *lunga experiență din al 2-lea război mondial și clarviziunea lui Sergent ne-a învățat că germenul tifosului exantematic, după vindecarea bolii la om, se poate păstra în organism timp foarte îndelungat. Tifosul exantematic de origine certă endogenă, la indivizii extrem de carențați din lagărele de tristă amintire din Germania hitleristă, indivizi care făcuseră un tifos exantematic 5 — 10 sau mai mulți ani înainte, dovedesc persistența germenului în organism. S-a dovedit că germenii rickettsieni ce dau febra de Wolhinia pot dăinui în organismul uman chiar și un sfert de secol.*

Iar afecțiunile cardio-vasculare de origine rickettsiană sau pararickettsiană — în lucrările lui Giroud și colab. ca și în cele foarte documentate ale școlii românești de inframicrobiologie — s-au dovedit a fi produse de germeni sălășluiți adesea în organism timp foarte îndelungat.

Scanned with OKEN Scanner

Oare toți acești germeni dăinuiesc în organism — după vindecarea bolii acute — ani și chiar zeci de ani ca atare, ca rickettsii sau ca pararickettsii? Datele actuale — care rămîn să fie aplicate în domeniul acizilor nucleici activi și la acești germeni — ne autorizează să credem că forma de lungă durată în organism a acestor germeni patogeni trebuie să fie tot cea moleculară, formă de acizi nucleici dotați cu posibilitatea reversibilității în forme „vegetative" inițiale, reversibilitate prilejuită de anumite cauze adjuvante.

★

Toate aceste deducții și interpretări decurgînd din noțiunile noi căpătate asupra formei moleculare active de acid nucleic viral ne arată, la o scară inferioară lumii virale, o nouă lume, infravirală, cu posibilitățile și manifestările ei dăunătoare. Aprofundarea cercetărilor în acest domeniu ne va da însă nu numai posibilități de interpretare ci și de aplicare creatoare a unor noi mijloace de luptă împotriva infecțiilor lungi și neimunizante încă zise „virale", dar în realitate, „infravirale", luptă în care mobilul esențial trebuie să fie transformarea formelor neimunogene de infravirus în forme virale corpusculare autentice — deci imunogene. *În acest caz, nu s-ar găsi oare, pe această cale, și tratamentul cancerului?*

Iată de ce, cartea de față asupra acizilor nucleici virali, sinteză a cunoștințelor actuale asupra subiectului ei, și în care contribuția cercetătorilor din țara noastră are o valoare deosebită, trebuie să devină o carte de căpătîi a oricărui inframicrobiolog care vrea să fie pionier în știință nouă.

Acad. **ȘT. S. NICOLAU**

Scanned with OKEN Scanner

TABLA DE MATERII

Pag.

Introducere 23
Generalităţi 27

Capitolul 1. COMPOZIŢIA ŞI STRUCTURA ACIZILOR RIBONUCLEICI

Compoziţia 29
Bazele purinice şi pirimidinice 29
Nucleozidele 34
Nucleotidele 38

Structura primară 47
Structura secundară 56
Structura terţiară 75
Morfologia moleculară 77

Capitolul 2. HIDROLIZA ACIZILOR RIBONUCLEICI

Hidroliza alcalină 85
Hidroliza acidă 90
Hidroliza enzimatică 94

Endonucleaze 94
Exonucleaze 104
Exo- şi endonucleaze 107

Capitolul 3. FOTOCHIMIA ACIZILOR RIBONUCLEICI

Absorbţia în ultraviolet 111
Iradierea cu raze ultraviolete (RUV) 120

Capitolul 4. REACŢIA ACIZILOR RIBONUCLEICI CU AGENŢII CHIMICI

Reacţia cu hidroxil-amina 143
Reacţia cu formaldehida 147

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

Reacţia cu hidrazina 153
Reacţia cu acidul azotos 153
Reacţia cu agenţii alchilanţi 156
Acţiunea ionilor metalici 157

Capitolul 5. SINTEZA ACIZILOR RIBONUCLEICI

Biosinteza enzimatică 161
Sinteza acizilor ribonucleici cu ajutorul polinucleotid-fosforilazei 163
Sinteza acidului ribonucleic cu ajutorul polimerazei ARN 172
Polimeraza virală 179
Sinteza polinucleotidelor cu secvenţă unică 184
Încorporarea nucleotidelor în poziţii terminale ale acidului ribonucleic 185
Sinteza neenzimatică a acizilor ribonucleici 187

Capitolul 6. ACIZII RIBONUCLEICI CELULARI

Principalele tipuri de acizi ribonucleici 193
Localizarea intracelulară a acizilor ribonucleici 204
Izolarea componenţilor celulari 212
Citochimia acizilor ribonucleici 216

Capitolul 7. EXTRACŢIA ŞI FRACŢIONAREA ACIZILOR RIBONUCLEICI

Extracţia acizilor ribonucleici 227
Fracţionarea acizilor ribonucleici pe coloană cromatografică 234
Fracţionarea ARN-*S* 234
Fracţionarea moleculelor înalt polimerizate 237

Capitolul 8. FIZIOLOGIE ŞI PATOLOGIE MOLECULARĂ

Rolul acizilor ribonucleici în sinteza proteinelor 251
Acizii ribonucleici infectanţi 270
Aspecte morfologice 304

APENDIX

Metode de dozare a acizilor ribonucleici 315
Metoda Schmidt şi Tanhauser 315
Metoda Schneider 317
Metoda Ogur şi Rosen 317
Metoda prin dozarea fosforului 318
Determinarea azotului total 319

Scanned with OKEN Scanner

	Pag.
Metode de extracţie a acidului ribonucleic total	321
Extracţia acidului ribonucleic total	321
Extracţia şi purificarea ARN viral cu ajutorul bentonitei	323
Extracţia acidului ribonucleic mono- şi bicatenar dintr-un ţesut	324
Extracţia acidului ribonucleic solubil	325
Analiza acidului ribonucleic extras	328
Reacţii de hidroliză a acidului ribonucleic	330
Separarea şi dozarea bazelor şi nucleotidelor acidului ribonucleic	333
Determinarea bazelor azotate cu ajutorul cromatografiei pe hîrtie	333
Separarea mononucleotidelor prin cromatografie pe hîrtie	337
Separarea electroforetică a mononucleotidelor	338
Separarea mononucleotidelor pe coloană cromatografică	339
Separarea bazelor, nucleozidelor şi nucleotidelor acidului ribonucleic pe coloană cromatografică	348
Fracţionarea acizilor ribonucleici pe coloană de albumină metilată	350
Fracţionarea moleculelor de ARN cu sulfat de streptomicină	352
Biosinteza acizilor ribonucleici	353
Extracţia şi purificarea polinucleotid-fosforilazei	353
Extracţia şi purificarea polimerazei ARN	361
Purificarea polimerazei ARN virale	364
Sinteza neenzimatică a unor nucleozide şi polinucleotide	367
Reacţia acidului ribonucleic cu agenţii chimici	368
Reacţia cu hidroxil-amină	368
Reacţia cu formaldehidă	369
Reacţia cu acidul azotos	370

Scanned with OKEN Scanner

INTRODUCERE

Amploarea cercetărilor realizate în ultimul deceniu asupra acizilor nucleici este impresionantă. Poate că nici o problemă nu a oferit atît material de studiu, prin diversitatea aspectelor sale, oamenilor de știință din cele mai variate discipline ca acizii nucleici. Într-adevăr, molecula de acid nucleic a fost studiată de către chimiști, fizicieni, fizico-chimiști, cibernetic ieni, efectele ei au preocupat pe inframicrobiologi, microbiologi, biologi, oncologi, fiziologi, geneticieni, filozofi. Cîteva premii Nobel au răsplătit munca unor savanți care și-au dedicat activitatea studiului acestor macromolecule. Anual se organizează numeroase simpozioane în care se dezbat ultimele descoperiri și se trasează noi directive de cercetare. Cele mai ingenioase tehnici, cele mai moderne aparate servesc astăzi celor mai inventive spirite, concentrate asupra aceluiași scop : descifrarea proprietăților spiralelor macromoleculare. Nenumărate laboratoare le consacră întreaga lor activitate, deosebit de numeroase sînt rezultatele publicate în ultimii zece ani.

În științele biologice, cunoașterea proprietăților acizilor nucleici a permis imaginarea unor noi modele experimentale și, în consecință, dirijarea cercetărilor pe noi drumuri. Inframicrobiologia s-a îmbogățit în ultimii ani cu o noțiune nouă, infectivitatea acizilor nucleici de origine virală, singurii compuși chimici responsabili de caracterul infectant și inductiv al virusurilor. Microbiologii au recunoscut în aceiași compuși chimici factorul care permite transformarea unor bacterii dintr-un tip în altul. În biologie, rolul acizilor nucleici ca substrat al unor fenomene observate în natură sau provocate experimental se precizează din ce în ce mai mult. Geneticienii descoperă noi coduri în moleculele acizilor nucleici, capabile de a explica variabilitatea spontană sau dirijată a organismelor. Oncologii constată rolul important al dereglării structurale a moleculei de acid dezoxiribonucleic celular în procesul de cancerizare. Teoriile filozofice permit aprofundarea și interpretarea fenomenelor vitale prin prisma cunoștințelor achiziționate asupra acizilor nucleici.

Chimiștii, fizicienii ca și cibernetic ienii au obținut în ultimii ani succese remarcabile în cercetările lor asupra structurii și funcțiunilor moleculelor de acizi nucleici.

Scanned with OKEN Scanner

În inframicrobiologie, prima dovadă asupra rolului acidului ribonucleic în infectivitatea virusurilor a fost adusă în 1956. Rezultatele revoluționare înregistrate cu acea ocazie au arătat că acidul ribonucleic extras din virusul mozaicului tutunului poate, el singur, să infecteze planta sănătoasă, tot astfel cum o face virusul întreg. În 1957 am întreprins, împreună cu colaboratorii mei, primele cercetări care urmau să demonstreze caracterul infectant al acidului ribonucleic izolat din virusul gripal și din cel al bolii Newcastle. De atunci problema acizilor nucleici infectanți, studiată sub variate aspecte, reprezintă principala direcție de cercetare a secției noastre din Institutul de inframicrobiologie al Academiei Republicii Socialiste România. Rezultatele obținute au format obiectul unui număr de aproximativ 100 de lucrări, publicate în revistele de specialitate din țară și străinătate. Dintre acestea, o parte importantă se referă atît la acizii ribonucleici infectanți de origine virală, cît și la cei normali, extrași din țesuturi.

În ultimii patru ani, L. Popa, doctor în științe tehnice, s-a alăturat colectivului nostru și conduce sectorul de structură biochimică a virusurilor din cadrul secției de biochimie și biofizică inframicrobiană. Este interesant de constatat că, înainte de a intra în institut, colaboratorul nostru de astăzi a avut o activitate susținută în cadrul unui colectiv de biologi, unde a studiat rolul genetic al acizilor nucleici. Datorită competenței sale în acest domeniu de cercetare ne-am putut uni eforturile pentru redactarea acestei monografii.

Datele obținute în urma cercetărilor biologice, chimice și fizice formează o parte din materialul întrebuințat la redactarea monografiei. În același timp am căutat să aducem în această lucrare atît datele considerate astăzi clasice, cît și cele mai recente descoperiri realizate pe plan mondial, pentru a-i da un caracter mai cuprinzător. Am căutat de asemenea să analizăm cît mai multe din variatele aspecte ale subiectului, pentru a interesa astfel un cerc mai larg de specialiști.

Împreună cu colegul L. Popa prezentăm monografia de față, în capitolele căreia se studiază compoziția și proprietățile moleculei de acid ribonucleic, metodele de extracție și analiză, localizarea intracelulară, infectivitatea acizilor ribonucleici virali, biosinteza polinucleotidelor, rolul în proteinosinteză, morfologia macromoleculei etc. La sfîrșitul volumului au fost grupate unele metode curente de lucru în laborator, utilizate în cercetările asupra acizilor ribonucleici. Am căutat astfel să îmbinăm aspectul teoretic al problemei cu cel practic, încercînd prin aceasta să facem mai utilă lucrarea noastră.

Titlul monografiei — acizii ribonucleici — este justificat de descoperirile din ultimii ani, care au dovedit pluralitatea acestor compuși. Lista lor crește necontenit, astfel încît astăzi se cunosc numeroși acizi ribonucleici, fiecare înzestrat cu o strictă specificitate și o funcție bine definită.

Înainte de a încheia această scurtă prezentare, țin să mulțumesc profesorului meu, academician Ștefan S. Nicolau, pentru tot sprijinul pe care mi l-a acordat în cei 25 de ani de activitate alături de domnia-sa. Țin, de asemenea, să-l asigur de sentimentele mele de recunoștință pentru cuvintele

Scanned with OKEN Scanner

calde, atît de încurajatoare, cu care mi-a răsplătit orice succes experimental obținut sau interpretare teoretică formulată.

Pentru ajutorul tehnic primit cu ocazia definitivării lucrării aducem și pe această cale mulțumiri colegilor noștri Victor Lăcătuș, Ana Morfei și Mircea Popescu.

Editurii Academiei Republicii Socialiste România îi adresez și cu această ocazie viile mele mulțumiri pentru condițiile editoriale oferite și pentru deosebita atenție acordată materialului acestei monografii.

RADU PORTOCALĂ
Doctor-docent în științe medicale

Scanned with OKEN Scanner

Prescurtări întrebuințate în text

A = adenină
ADN = acid (acizii) dezoxiribonucleic (i)
ADP = adenozindifosfat
AM = albumină metilată
AMC = albumină metilată adsorbită pe celită
AMP = adenozinmonofosfat
ARN = acid (acizii) ribonucleic (i)
ARN-*M* = acid ribonucleic mesager
ARN-*S* = acid ribonucleic solubil
ARN-*T* = acid ribonucleic de transfer
ATP = adenozintrifosfat
C = citozină
CMP = citidinmonofosfat
GMP = guanozinmonofosfat
Hy = hipoxantină
Poli-A = acid poliadenilic
Poli-C = acid policitidilic
Poli-G = acid poliguanilic
Poli-U = acid poliuracilic
RUV = raze ultraviolete
T = timină
U = uracil
VMT = virusul mozaicului tutunului

Scanned with OKEN Scanner

Generalităţi

Paternitatea descoperirii acizilor nucleici îi revine lui Miescher, care în 1871 semnalează pentru prima oară izolarea din nucleii celulari a unei substanţe cu un conţinut bogat în fosfor. Autorul numeşte această substanţă particulară, necunoscută pînă atunci, „nucleina". Deoarece pînă la acea dată, singurul compus cunoscut care conţinea fosfor era lecitina, descoperirea lui Miescher a fost primită cu multă rezervă. A fost necesară efectuarea unor lucrări de control, realizate de însuşi profesorul lui Miescher, pentru ca marea sa descoperire să fie recunoscută.

Termenul de „acid nucleic" a fost imaginat de Altmann şi introdus pentru prima dată în terminologia ştiinţifică în 1889. Acest autor pune la punct o metodă de preparare a noului compus, în stare pură, lipsit de proteină. Tot el reuşeşte să extragă, cu tehnica pe care o preconizase, acidul nucleic din drojdia de bere şi din diferite ţesuturi de origine animală. În 1894, Kossel şi Neumann imaginează şi verifică o tehnică de extracţie a acidului nucleic, care le-a permis să izoleze acest compus din timus.

Substanţa nou descoperită este repede supusă analizelor chimice, în scopul precizării naturii şi compoziţiei. Se constată astfel că ea conţine 9,59% fosfor. Piccard descrie în 1874 bazele purinice prezente în acidul nucleic; Kossel izolează, în 1879, xantina şi adenina şi, împreună cu Neumann, identifică în 1894 timina. În 1902, Kossel şi Stendel semnalează prezenţa citozinei în acidul nucleic extras din timus, în timp ce Ascoli găsise, în 1900, în acidul nucleic extras din drojdie, uracilul.

Levene identifică zahărul existent în molecula de acid nucleic extras din drojdie cu riboza şi pentoza prezentă în compusul extras din timus cu dezoxiriboza. De aici provine denumirea dată celor doi acizi nucleici: acid ribonucleic şi acid dezoxiribonucleic.

Concepţia iniţială asupra repartiţiei în natură a celor doi acizi nucleici, care ulterior s-a dovedit eronată, susţinea existenţa acidului ribonucleic exclusiv în regnul vegetal, în timp ce acidul dezoxiribonucleic ar constitui componentul caracteristic regnului animal.

În 1940 se situează cercetările realizate independent de Caspersson şi de Brachet, care, cu tehnici diferite, obţin rezultate care converg spre aceeaşi constatare: existenţa ambilor compuşi în celulele ambelor regnuri. Studiile citochimice întreprinse de aceşti doi autori au adus precizări importante asupra localizării intracelulare a acizilor nucleici, rolul lor în procesele metabolice celulare etc. Rezultatele pe care cei doi pionieri ai citochimiei le-au înscris în istoria descoperirii acizilor nucleici reprezintă astăzi preţioase achiziţii fundamentale pentru ştiinţele biologice.

Scanned with OKEN Scanner

Rolul important al acidului ribonucleic în cadrul proceselor patologice a fost demonstrat cu succes în cazul inframicrobilor. O primă descoperire care a avut un răsunet cu totul impresionant a fost cristalizarea virusului mozaicului tutunului, reuşită pentru prima dată în lume de Stanley în 1935. Analizele chimice realizate de Bawden şi Pirie au dovedit că aceste cristale, constituite din virus în cel mai înalt grad de puritate, sînt din punct de vedere chimic ribonucleoproteine.

În 1956, Gierer şi Schramm, pe de o parte, şi Fraenkel-Conrat pe de alta, ajung în acelaşi timp la o concluzie revoluţionară : acidul ribonucleic extras din virusul mozaicului tutunului este purtătorul întregii capacităţi infectante a virusului. Descoperire epocală, care avea să modifice unele concepţii teoretice de inframicrobiologie. Este, poate, interesant de subliniat că descoperirea lui Gierer şi Schramm a fost făcută în laboratoarele din Tübingen, unde cu 85 de ani mai înainte Miescher descoperise acidul nucleic.

În 1957 se situează primele noastre încercări experimentale care aveau să ne conducă la constatarea că acidul ribonucleic izolat din virusuri mari şi chimic complexe, ca virusul gripal şi cel al bolii Newcastle, este înzestrat cu proprietăţi infectante şi inductive. În 1963 am dovedit că un acid ribonucleic infectant poate servi ca „primer" şi în această calitate determină propria sa biosinteză într-un mediu acelular.

Ca o încununare a descoperirilor din ultimii zece ani în domeniul acizilor nucleici, în 1955 Ochoa reuşeşte biosinteza enzimatică *in vitro* a unui acid ribonucleic, de altă natură decît virală, deci neinfectant. Este important faptul că această sinteză este dirijată de prezenţa unui acid ribonucleic, care serveşte ca „primer".

În cei aproape 100 de ani care s-au scurs de la epocala descoperire făcută de Miescher, oamenii de ştiinţă din lumea întreagă au îmbogăţit, prin munca lor neobosită, patrimoniul cunoştinţelor noastre. Astăzi se cunosc numeroşi acizi ribonucleici şi rolul lor în celulă, microorganisme sau virusuri a fost în mare măsură elucidat, dar curiozitatea nesecată a cercetătorilor înscrie necontenit pe lista deschisă cu un secol în urmă noi tipuri, cu noi proprietăţi, cu noi funcţiuni.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 1

COMPOZIȚIA ȘI STRUCTURA ACIZILOR RIBONUCLEICI

Compoziția

Acizii ribonucleici (ARN) sînt polimeri organici ale căror unități structurale (monomerii) sînt nucleotidele. Dacă numărul nucleotidelor polimerizate este între 2 și 7, compusul este denumit oligonucleotid, în timp ce, atunci cînd el conține peste 7 nucleotide, se numește polinucleotid.

Nucleotidele, la rîndul lor, sînt constituite din trei componente:

a) o bază azotată, care poate fi o bază purinică sau pirimidinică (B);
b) o pentoză, care este întotdeauna D-riboza (R) și
c) acidul fosforic (P).

Schematic, structura acidului ribonucleic poate fi ilustrată astfel:

$$(B - R - P)\,n$$

în care n reprezintă gradul de polimerizare, iar B, R și P compușii menționați.

BAZELE PURINICE ȘI PIRIMIDINICE

Hidroliza totală a acizilor ribonucleici naturali a condus în mod obișnuit la obținerea a patru baze azotate. Două dintre acestea — adenina și guanina — aparțin clasei purinelor, iar celelalte — citozina și uracilul — clasei pirimidinelor. În afara lor s-au mai găsit, în ultimul timp, și alte baze azotate ale acidului ribonucleic, însă în cantitate mult mai mică decît primele. Punerea în evidență a acestora a întîmpinat, uneori, anumite dificultăți. Dintre purine s-au descoperit, în anumite cazuri, prezența *1*-metil-adeninei (Dunn, 1961), a *2*-metil-adeninei, a *6*-dimetil-aminopurinei (Littlefeld și Dunn, 1958), precum și derivați ai guaninei: *1*-metil-guanina, *6*-hidroxi-*2*-metil-amino-purina și *6*-hidroxi-*2*-dimetil-amino-purina (Smith și Dunn, 1959).

Alături de cele două pirimidine amintite mai sus s-au putut identifica, în unele hidrolizate ale acizilor ribonucleici, *5*-metil-citozina (Amos și Korn, 1958), timina (Littlefeld și Dunn, 1958; Davis și colab., 1959).

Scanned with OKEN Scanner

Structura şi nomenclatura bazelor purinice şi pirimidinice ale acizilor ribonucleici sînt înregistrate în figura 1.

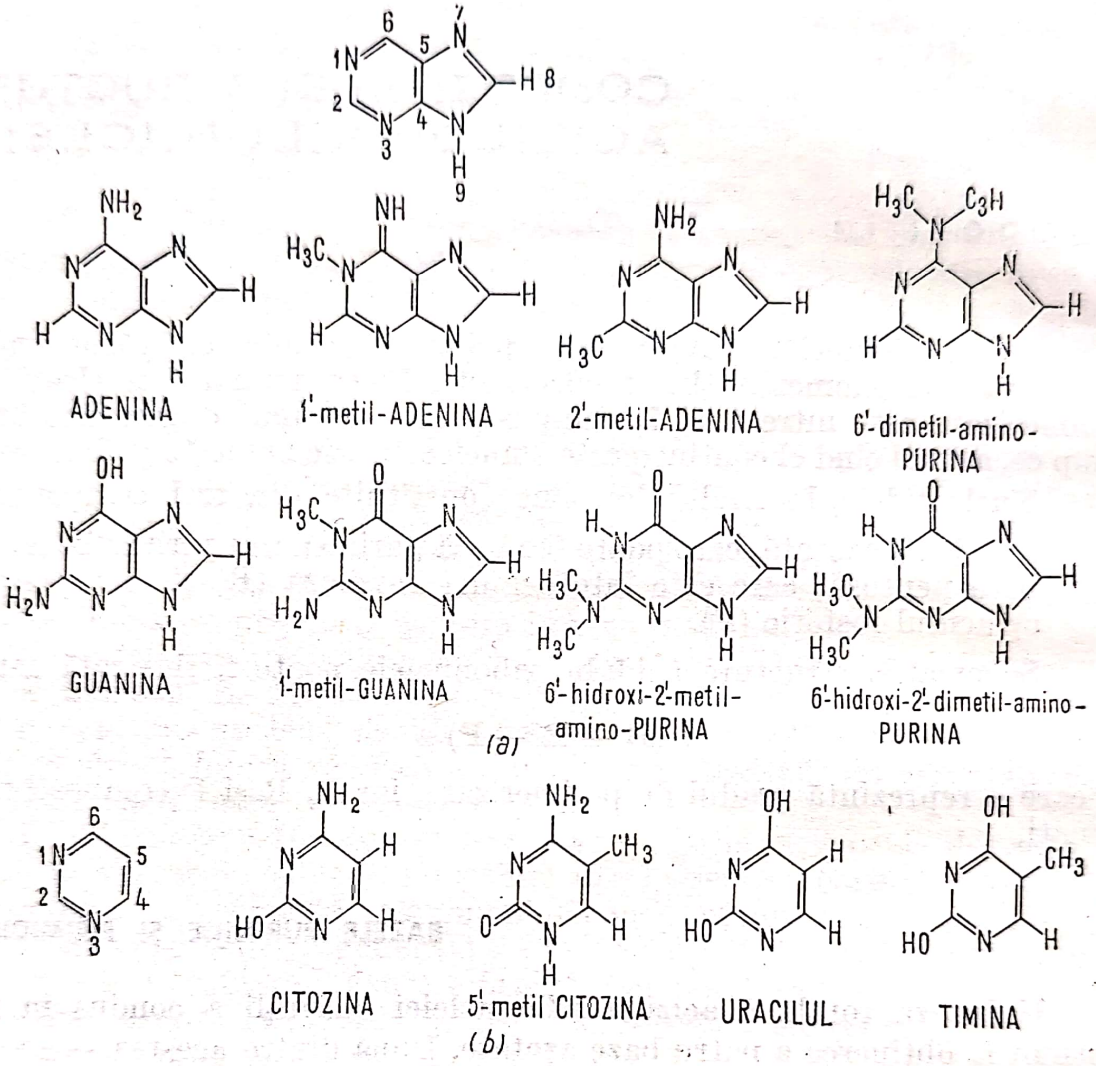


Fig. 1.—a) Baze purinice puse în evidenţă în acizii ribonucleici. *b*) Baze pirimidinice descoperite în acizii nucleici.

Întrucît primele patru componente, şi anume adenina, guanina, citozina şi uracilul, se găsesc întotdeauna în hidrolizatele de ARN, ele sînt considerate ca baze azotate principale, în timp ce derivaţii lor, care se întîlnesc în mod sporadic şi totodată în cantităţi mici, sînt denumite baze azotate rare de ARN.

Sinteza principalelor baze purinice şi pirimidinice ale acidului ribonucleic. Adenina şi guanina au fost puse în evidenţă în produşii de hidroliză ai acizilor nucleici de către Kossel (1883, 1886), iar sinteza lor totală a fost realizată de Traube (1904). Metoda directă de sinteză a guaninei

pornește de la *2,4,5*-triamino-*6*-hidroxi-pirimidină, care, prin fierbere la reflux în prezența unui amestec de acid formic și formiat de sodiu, conduce la obținerea guaninei, fără a fi necesară izolarea compusului intermediar *5*-formil (fig. 2).

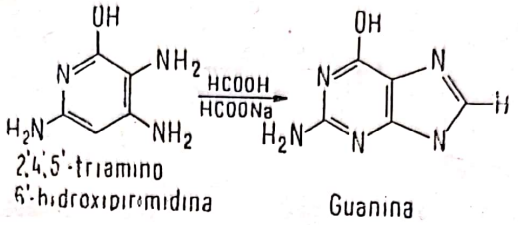


Fig. 2.— Sinteza guaninei (după Traube, 1904).

Ulterior s-au descris numeroase variante ale sintezei bazelor azotate ale acidului ribonucleic. Astfel, Cavalieri și Brown (1949) obțin adenina marcată pornind de la fenil-azomalononitril și formamidă, ambele marcate cu izotopi radioactivi (fig. 3).

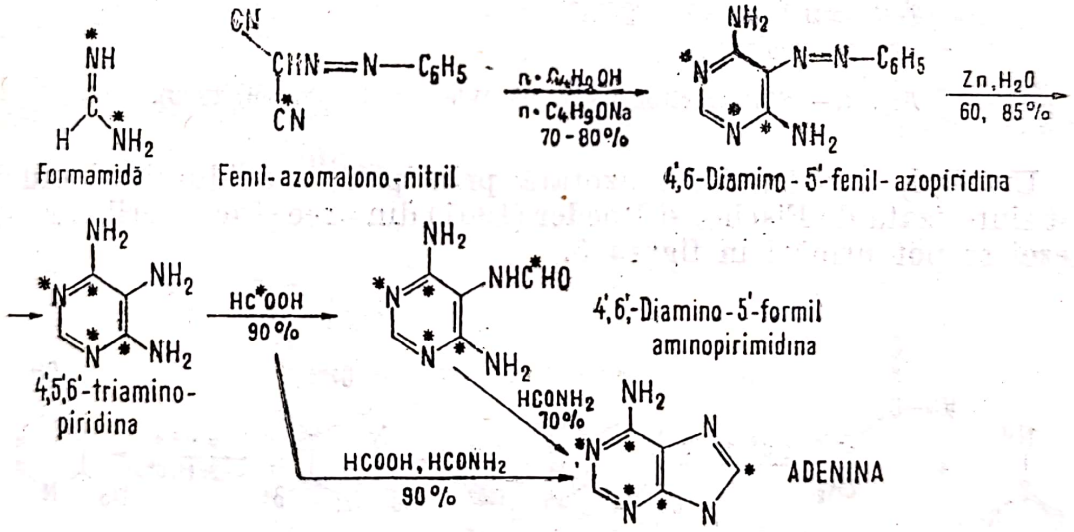


Fig. 3.— Sinteza adeninei marcate (după Cavalieri și Brown, 1949).

După Wheeler și Johnson (1903), sinteza citozinei are loc prin condensarea la temperatura camerei, în soluție alcalină, a *5*-etil-tioureei cu etil-formil-acetatul. Se obține astfel *2*-etil-mercapto-*6*-hidroxi-pirimidină. În continuare, printr-un tratament cu PCl_5 se înlocuiește gruparea *6*-hidroxi cu clor. La rîndul său, clorul este înlocuit cu gruparea aminică prin tratarea produsului obținut cu amoniac în soluție alcoolică. În sfîrșit, gruparea etil-mercapto- este înlocuită cu o grupare hidroxil în urma unei hidrolize cu HBr la 125°C. Citozina rezultată este identică în ceea ce pri-

veşte proprietăţile sale cu aceea obţinută prin hidroliza acizilor ribonucleici naturali. Etapele sintezei sînt redate în figura 4.

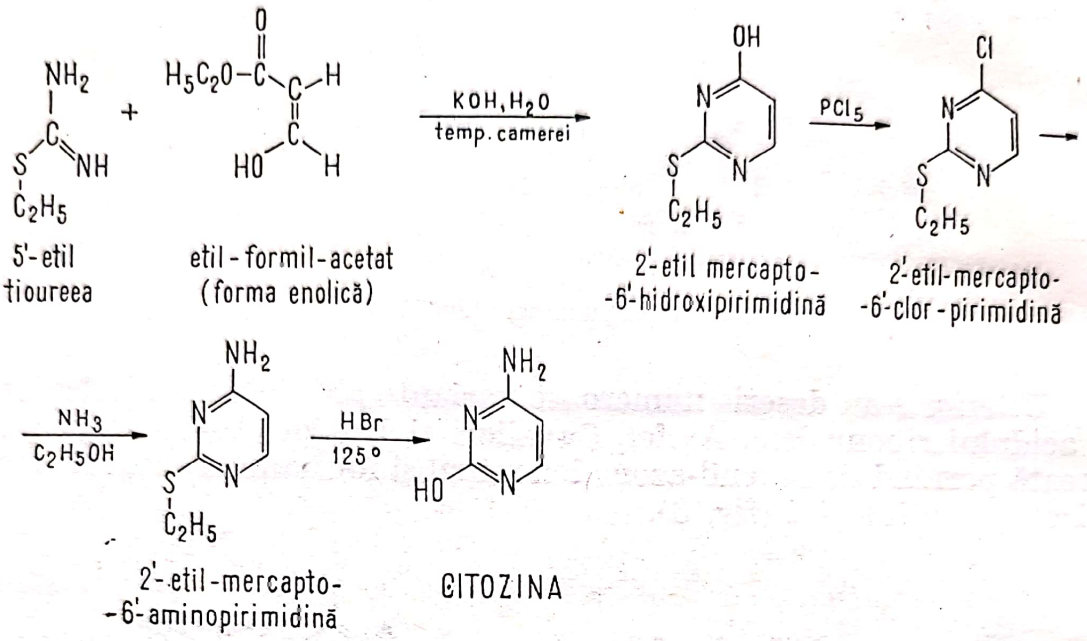


Fig. 4.— Sinteza citozinei (după Wheeler şi Johnson, 1903).

Uracilul, a patra bază azotată principală a acidului ribonucleic, a fost sintetizată de Fischer şi Roeder (1901) din uree şi acid acrilic. Etapele sintezei se pot urmări în figura 5.

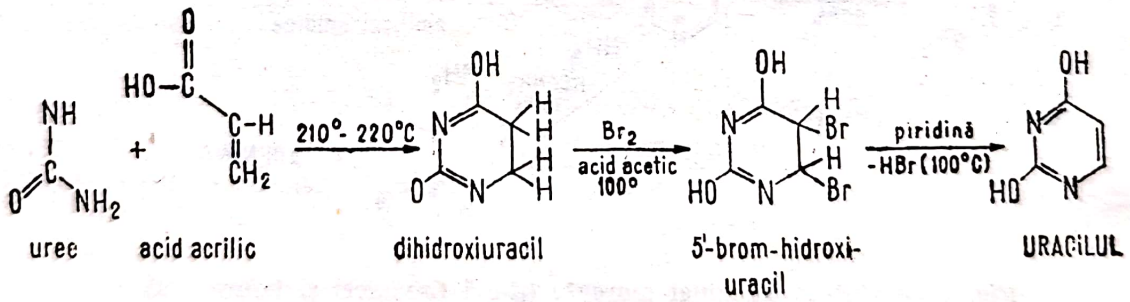


Fig. 5. — Sinteza uracilului (după Fischer şi Roeder, 1901).

Biosinteza bazelor purinice şi pirimidinice. Administrarea unor substanţe simple, marcate cu C^{14} şi N^{15}, la diferite animale de laborator, în culturi celulare sau în omogenate de ţesuturi şi fragmente de organe, au precizat natura diferiţilor precursori ai bazelor purinice şi pirimidinice ale acidului ribonucleic. În acest mod s-a putut demonstra că, în cazul ciclului purinic, atomul de azot (N_1) provine din gruparea aminică a acidului aspartic sau glutamic, atomii C_2 şi C_8 din formiat, atomii N_3 şi N_9

din gruparea amidică a glutaminei, C_6 din CO_2, iar C_4, C_5 și N_7 din glicocol (fig. 6).

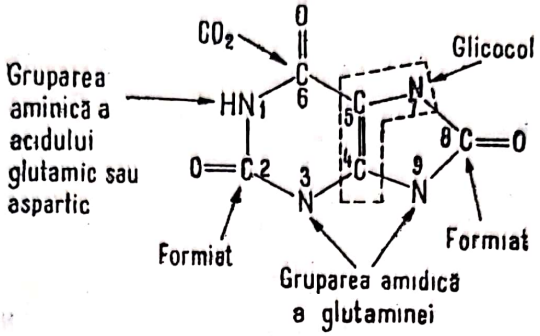


Fig. 6. — Precursorii diferiților atomi ai ciclului purinic (după Reichard, 1955).

În ceea ce privește pirimidinele, majoritatea cercetătorilor admit că acidul orotic are un rol intermediar în biosinteza acestor heterocicluri. După Reichard și Lagerkvist (1953), sinteza acidului orotic se realizează din NH_3, CO_2 și acid aspartic în prezența carbamil-glutamatului sau a acetil-glutamatului, a ATP și a ionilor de magneziu.

Acidul L-ureidosuccinic, care se formează ca intermediar, este ulterior ciclizat, obținîndu-se acidul dihidroorotic, care prin dehidrogenare dă naștere la acidul orotic (fig. 7).

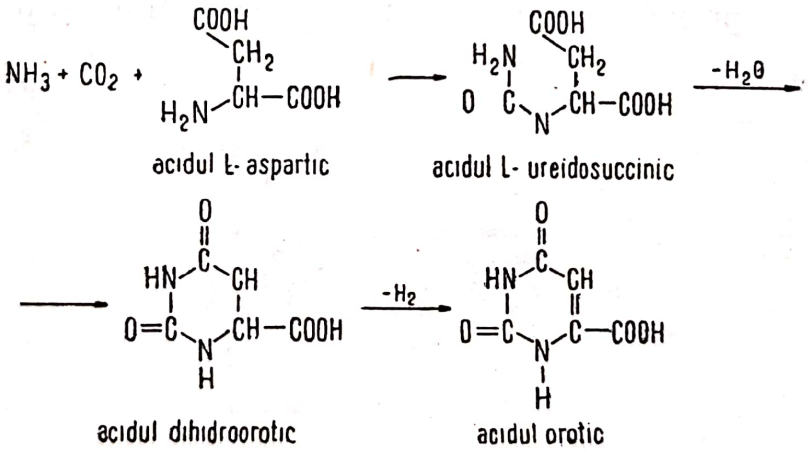


Fig. 7.—Biosinteza acidului orotic (după Reichard și Lagerkvist, 1953).

În această biosinteză care decurge în mai multe etape, intervin mai multe enzime. Se pare că în prima etapă a sintezei are loc activarea CO_2 și NH_3, iar în a doua, condensarea acidului aspartic cu intermediarii activați. Etapele următoare sînt de asemenea controlate de enzime specifice.

Din acidul orotic astfel sintetizat pot lua naştere, în continuare, atît uridina, cît şi citidina (fig. 8).

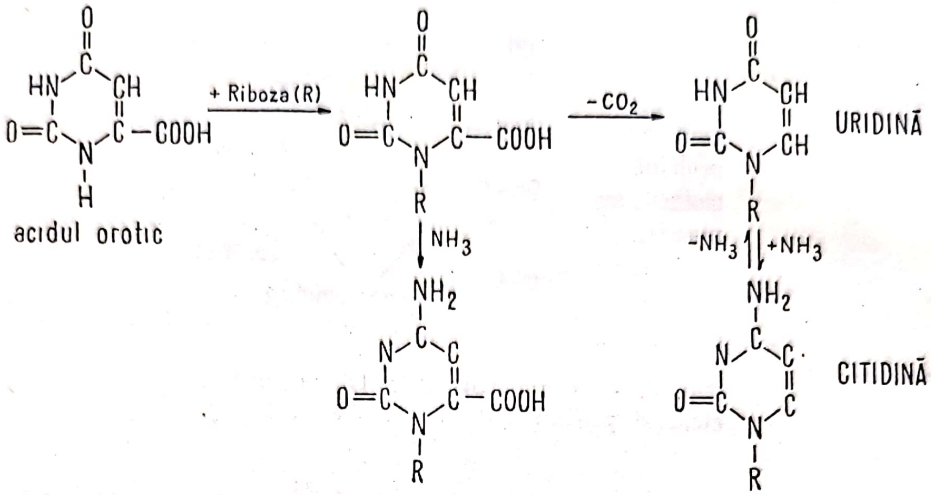


Fig. 8. — Reacţiile de biosinteză a uridinei şi citidinei din acidul orotic (după Arvidson şi colab., 1949).

NUCLEOZIDELE

Denumirea de „nucleozide" a fost atribuită de Levene şi Iacobs (1909) derivaţilor obţinuţi din hidrolizatele de ARN de drojdie, care erau constituiţi dintr-o bază purinică şi un hidrat de carbon. Astăzi, clasa nucleozidelor cuprinde toate glicozidele bazelor purinice şi pirimidinice.

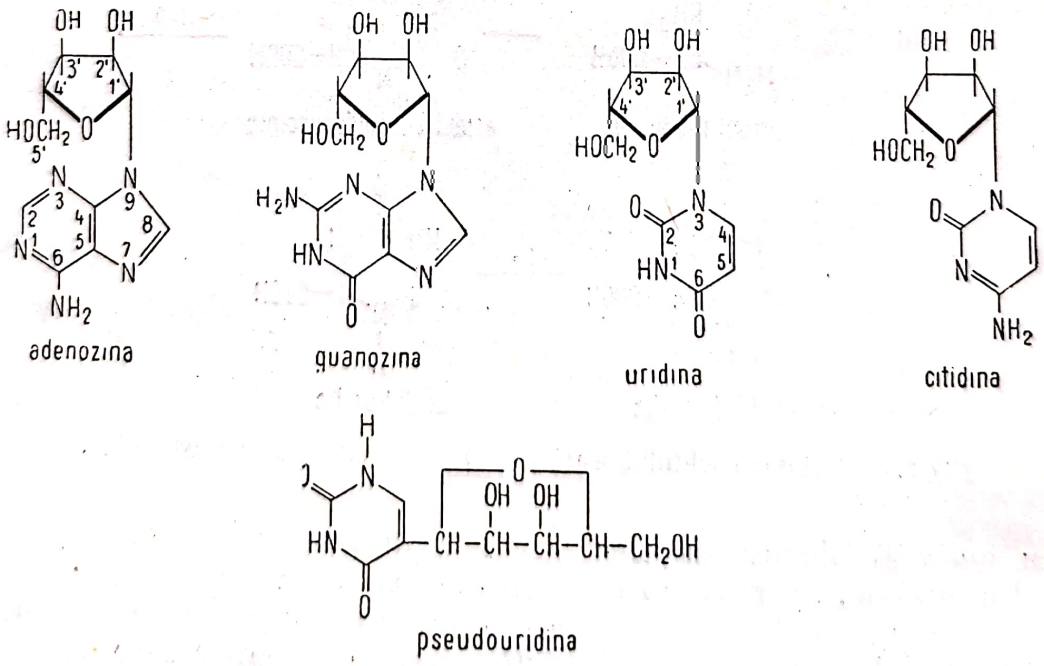


Fig. 9. — Principalele nucleozide ale acizilor ribonucleici.

Nucleozidele principale ale acizilor ribonucleici sînt: adenozina, guanozina, citidina și uridina și mai rar pseudouridina. Trebuie menționat că izomerul uridinei, pseudouridina, se găsește în unele preparate de acizi ribonucleici într-o proporție destul de mare, fapt care motivează includerea ei în această categorie (fig. 9).

În afară de acestea, din ARN de diferite origini s-au mai izolat nucleozidele corespunzătoare bazelor rare, denumite pentru acest motiv nucleozide rare sau minore (fig. 10).

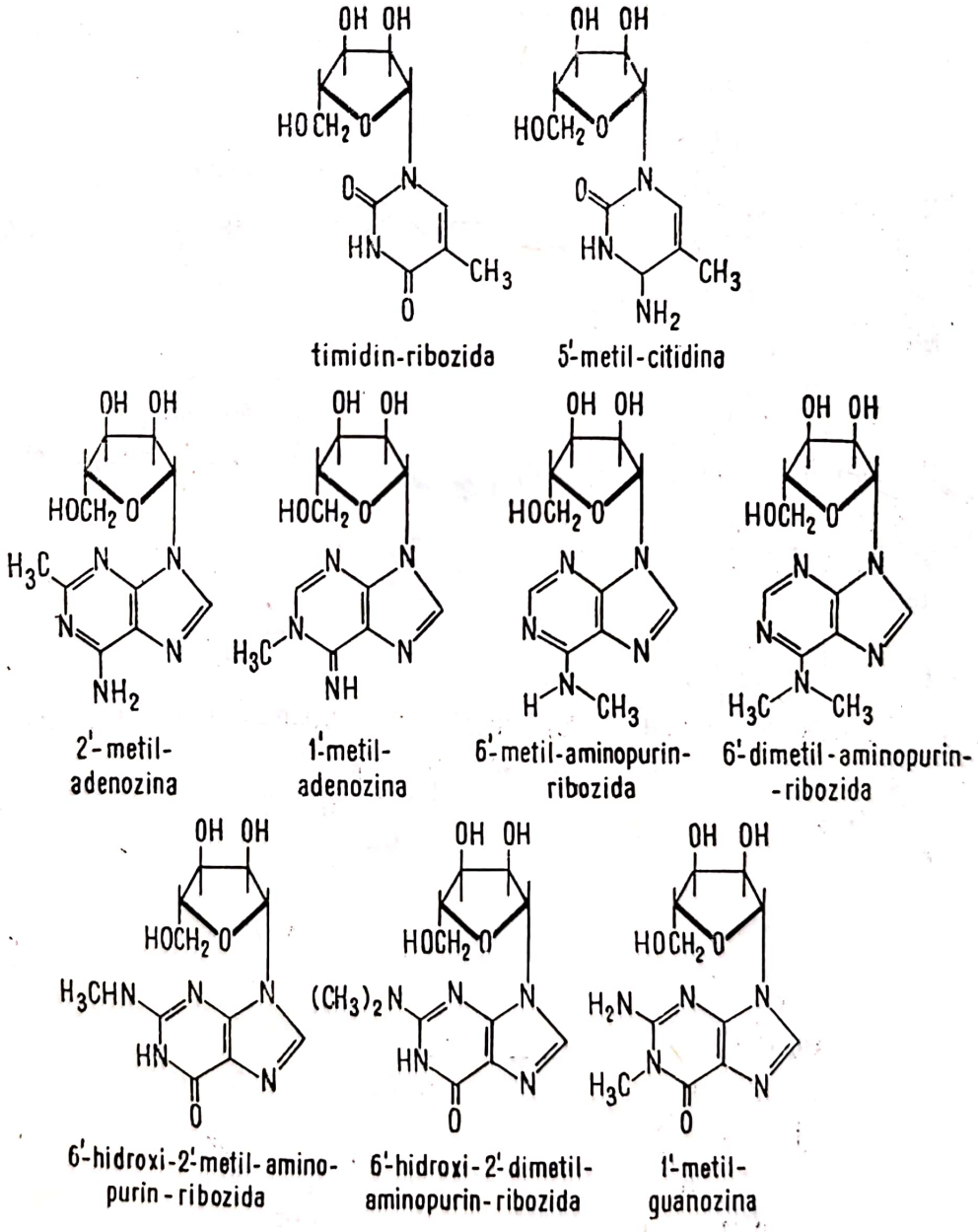


Fig. 10. — Nucleozidele rare ale acizilor ribonucleici.

Sinteza nucleozidelor. Există mai multe metode de preparare a nucleozidelor. Dintre acestea, deosebit de importantă este sinteza adenozinei din derivați glicozilici simpli. Metoda a fost dezvoltată de Todd și colaboratorii săi. Tratamentul *4,6*-diamino-*2*-metil-tiopiridinei cu *2,3,4*-tri-O-acetil-*5*-O-benzil-D-riboza a dat naștere la o bază Schiff, care după deacetilare a devenit derivat *5'*-O-benzil-D-ribofuranozil.

Acesta a fost cuplat cu *2,5*-dicloroanilină diazolată, iar compusul azo brut acetilat s-a purificat apoi prin cromatrografie. În continuare, el a fost redus, cu zinc și acid acetic, la compusul *5*-amino corespunzător, care ulterior s-a tioformilat cu ajutorul acidului ditioformic. A rezultat *2*-metil-tio-*4*-(*5'*-O-benzil-D-ribofuranosil-amina)-*5*-tioformamida-*6*-amino-piridina, care s-a ciclizat, folosind în acest scop metoxidul de sodiu. Pro-

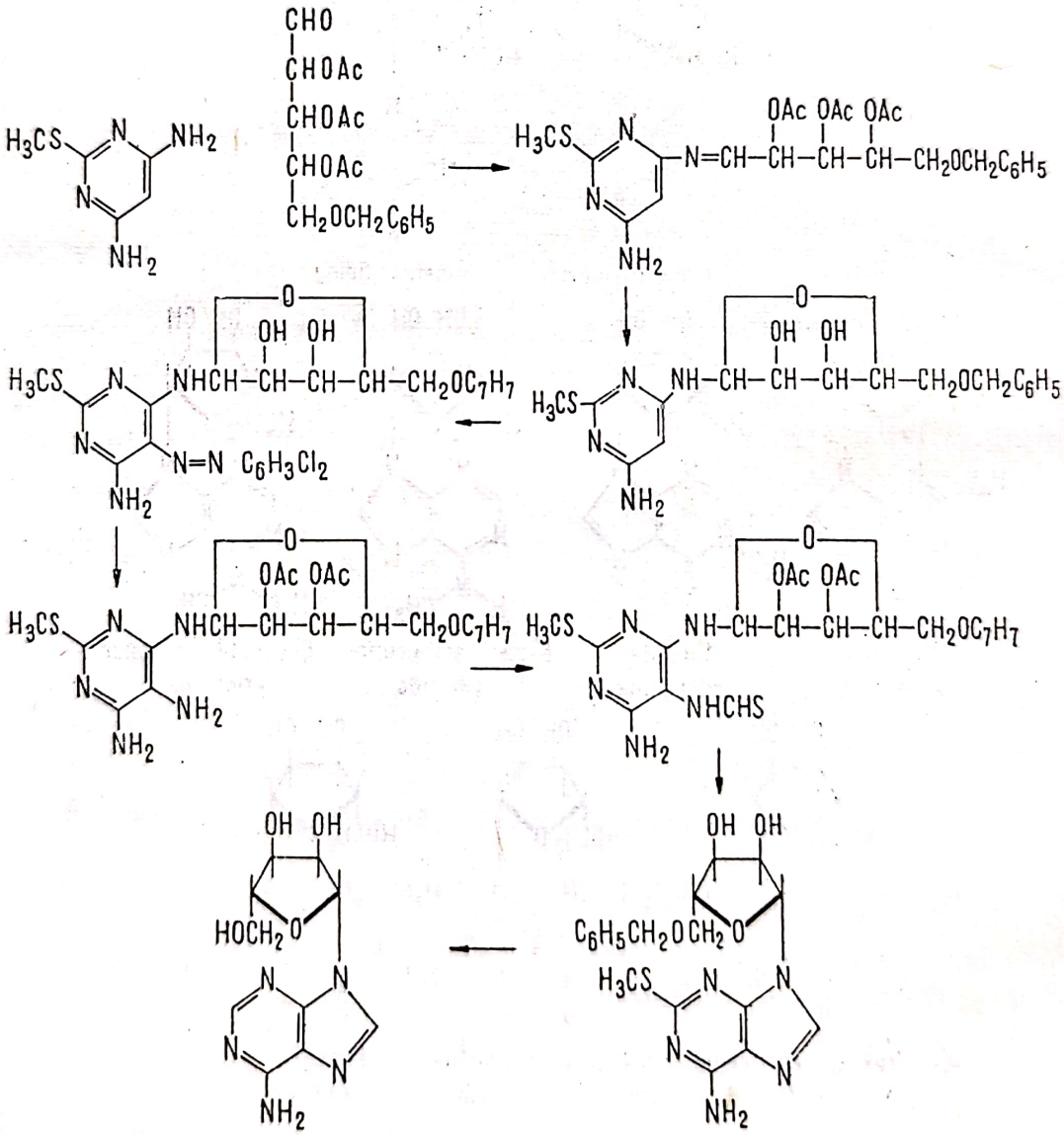


Fig. 11. — Sinteza adenozinei (după Kenner și colab., 1949).

dusul a fost apoi tratat cu Nichel Raney pentru a îndepărta grupările 2-metil-tio și 5-benzil. Prin diacetilare s-a obținut astfel adenozina (fig. 11).

O altă cale de sinteză a nucleozidelor a fost inițiată de Emil Fischer și colaboratorii săi. Ea constă în cuplarea unor hidrați de carbon cu bazele azotate. De obicei se tratează sărurile de argint ale bazelor cu acetohalogenurile unui hidrat de carbon. De exemplu, sarea de argint a 2,8-diclor-adeninei se cuplează cu acetonobromglucoză pentru a da compusul 9-glicozilic. Prin dehalogenarea 2,8-dicloro-9-glicoziladeninei se ajunge la 9-β-D-glucopironoziladenina (Fischer și Helferich, 1914). Adenozina și guanozina au fost preparate printr-un procedeu asemănător, întrebuințîndu-se clorura de tri-O-acetil-D-ribofuranosil și sarea de argint a 2,8-diclor-adeninei (Davoll și colaboratori, 1948). Adenozina s-a obținut prin dehalogenarea hidrogenolitică completă a produsului intermediar, 9-β-D-ribozil-2,8 diclor-adenina. O dehalogenare parțială a dat naștere la 2-clor-adenozină. Aceasta din urmă s-a obținut mult mai ușor, deoarece atomul de clor din poziția 9 este mai reactiv decît cel din poziția 2.

În continuare, 2-clor-adenozina a fost dezaminată cu acidul azotos, obținîndu-se 2-clor-6-hidroxi-purin-nucleozidul, care prin tratare cu amoniac a fost convertit în guanozină.

Metoda de cuplare a unei baze azotate cu acetohalogenurile unor glucide a fost întrebuințată și pentru sinteza citidinei și uridinei. În acest caz s-a pornit de la 2,6-dietil-hidroxipiridină și acetobrom-ribofuranoza. (fig. 12).

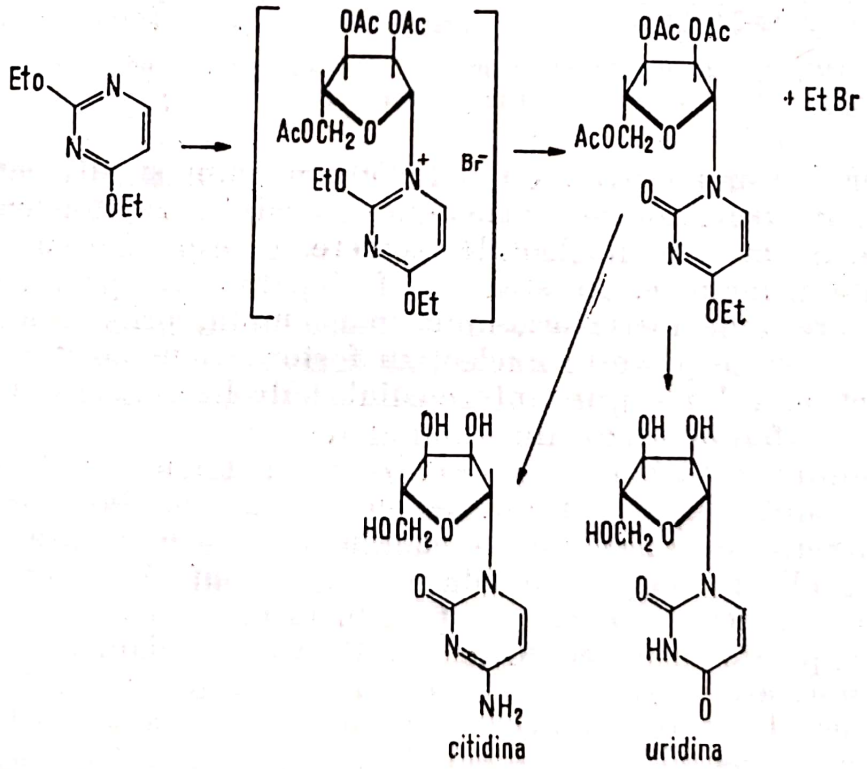


Fig. 12. — Sinteza citidinei și a uridinei (după Howard și colab., 1947).

NUCLEOTIDELE

Sînt esterii fosforici ai nucleozidelor. Termenul de „nucleotid" a fost propus pentru prima dată de Levene şi Mandel (1908), pentru a denumi compuşii izolaţi din hidrolizatele acide ale acidului nucleic din timus. Din produşii de hidroliză a acidului ribonucleic, Levene şi Harris (1932) au separat patru nucleotide: adenozin-*3'*-fosfatul, guanozin-*3'*-fosfatul, citidin-*3'*-fosfatul şi uridin-*3'*-fosfatul. În funcţie de poziţia (*2'*, *3'* sau *5'*) în care acidul fosforic esterifică riboza pot exista trei izomeri naturali pentru fiecare tip de ribonucleotid (fig. 13).

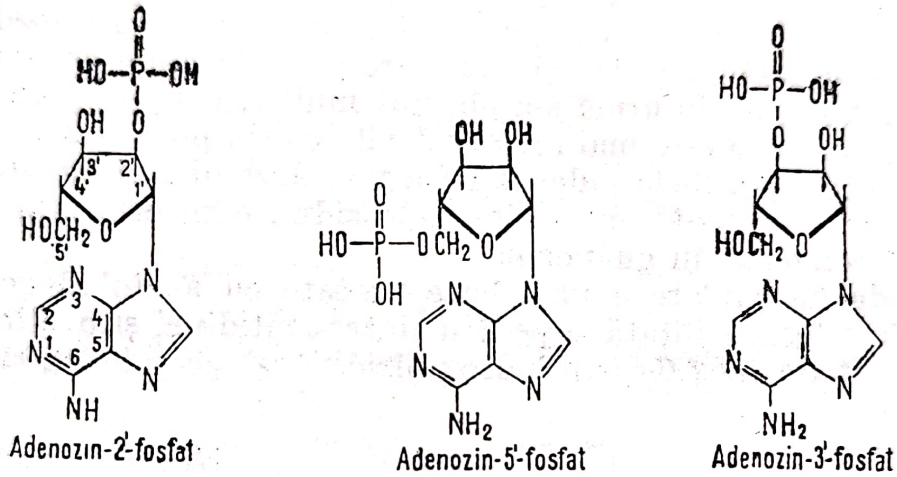


Fig. 13. — Nucleotidele izomere corespunzătoare unei singure baze (adenina).

Carter şi Cohn (1949), Cohn (1950), precum şi alţi cercetători au dovedit că, în urma hidrolizei alcaline a acidului ribonucleic, se obţine un amestec de *2'* şi *3'* nucleotide izomere, corespunzătoare celor patru baze azotate principale. Acestea pot fi separate fie prin cromatografie sau electroforeză pe hîrtie ori, mult mai simplu, prin cromatografie pe coloană. În ceea ce priveşte nucleotizii fosforilaţi în poziţia *5'*, ei pot fi obţinuţi cel mai bine prin intermediul hidrolizei acidului ribonucleic efectuat cu fosfodiesteraza din veninul de şarpe.

Se admite astăzi că cei doi izomeri: nucleozid-*2'* şi *3'*-fosfaţii puşi în evidenţă în urma hidrolizei alcaline a acidului ribonucleic iau naştere dintr-un intermediar ciclic comun. În soluţie alcalină, izomerii *2'* şi *3'* sînt stabili, în timp ce în soluţie acidă ei suferă un proces de interconversiune, fapt care a determinat ca în primele lucrări să nu se poată stabili exact poziţia grupării fosforice. Brown şi colab. (1952) au reuşit chiar să sinterizeze acest intermediar ciclic şi au dovedit că prin hidroliză el trece cu uşurinţă într-un amestec de nucleozid-*2'* şi *3'*—fosfaţi (fig. 14).

Fosfaţii ciclici au fost puşi în evidenţă în urma acţiunii ribonucleazei asupra acidului ribonucleic, prin degradarea acestui compus cu carbonat

de bariu (Markham și Smith, 1952) sau cu butoxid terțiar de potasiu (Lipkin și Talbert, 1955). De asemenea, ei au putut fi obținuți prin încălzirea soluțiilor de acizi nucleici cu formamidă și amoniac (Tanaka, 1960).

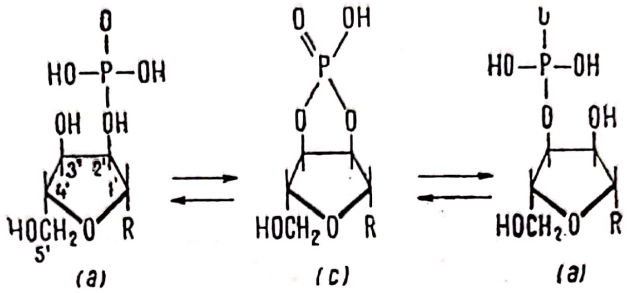


Fig. 14. — Interconversia nucleotidelor izomere (*a*) cu ajutorul intermediului ciclic (*c*).

Nucleotidele ciclice au avut o importanță deosebită atît pentru elucidarea diferiților izomeri ai nucleotidelor, cît și pentru cercetările care au stabilit mecanismul de hidroliză chimică și enzimatică a acizilor ribonucleici.

Sinteza nucleotidelor. De obicei, succesul sintezei nucleotidelor depinde în mare parte de agentul de fosforilare întrebuințat pentru a introduce gruparea fosforică în molecula nucleozidelor și de felul în care au fost blocate toate grupele funcționale în afară de hidroxidul ribozei la care se urmărește esterificarea. Nerespectarea acestor reguli conduce la o fosforilare întîmplătoare. Pe de altă parte, dat fiind faptul că unele nucleotide sînt instabile, este foarte important ca grupele protectoare introduse să poată fi ușor îndepărtate în condiții experimentale relativ blînde. Altfel, produșii de reacții vor fi amestecuri complexe (Michelson, 1963).

Întrucît nucleozid-*5'*-fosfații și mai ales derivații lor, *5'*-di și *5'*-trifosfații au o mare importanță pentru biosinteza acizilor nucleici, vom descrie în continuare numai sinteza unor compuși din această categorie de izomeri. Sinteza adenozin-*5'*-fosfatului, după Baddiley și Todd (1947), decurge astfel: tratarea *2',3'*-O-izopropiliden-adenozinei cu clorfosfatul de dibenzil dă naștere la *5'*-benzil-fosfatul corespunzător, din care se elimină apoi gruparea benzilică prin hidrogenoliză catalitică. Ulterior, reziduul izopropilidenic este scindat sub acțiunea unui acid diluat, obținîndu-se adenozin-*5'*-fosfatul. O variantă a acestei metode constă în hidroliza în mediu slab acid a *2',3'*-O-isopropiliden-adenozin-*5'*-dibenzil-fosfatului la adenozin-*5'*-benzil-fosfat, din care se eliberează apoi adenozina prin hidrogenoliză (fig. 15).

Sinteza derivaților guanozinei s-a realizat întrebuințîndu-se tetra-alchil și tetra-aril pirofosfații ca agenți de fosforilare. Metoda utilizată

de Chambers şi colaboratori (1957) pentru sinteza guanozin-5′-fosfatului porneşte de la 2′,3′-O-izopropiliden-guanozină şi tetra-*p*-nitrofenil-pirofosfat. S-a obţinut astfel 2′-3′-O-izopropiliden-guanozin-5-di-*p*-nitrofenil-sulfat. În urma unei hidrolize în mediu slab alcalin se îndepărtează un

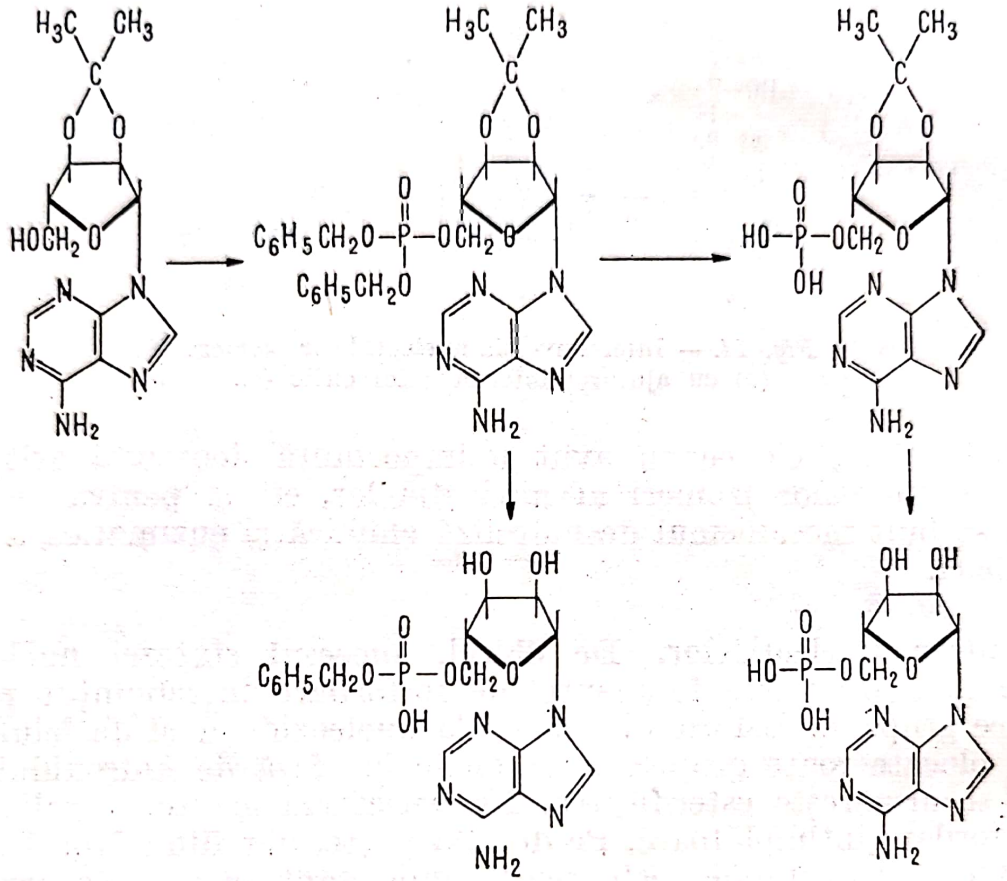


Fig. 15. — Sinteza adenozin-5′-fosfatului (după Baddiley şi Todd, 1947).

reziduu *p*-nitrofenolic. Pentru eliminarea celuilalt reziduu sînt necesare condiţii de hidroliză alcalină mult mai energice, ceea ce determină însă defosforilarea produsului. Calea aceasta a trebuit să fie deci abandonată. Hidroliza monoaril-nucleotidului cu venin de şarpe (fosfodiesteraza) s-a dovedit a fi mult mai eficientă în acest scop. Trebuie precizat că produsul rezultat, datorită prezenţei grupării 2′,3′-O-izopropiliden, a fost insensibil faţă de 5′-monoesteraza existentă şi ea în veninul de şarpe. La sfîrşit, această grupă s-a eliminat prin hidroliză în mediu slab acid sau prin alte procedee întrebuinţate în acest scop şi s-a obţinut, cu un randament bun, guanozin-5′-fosfatul.

În ceea ce priveşte sinteza ribonucleozid-5′-fosfaţilor pirimidinici, se pare că cel mai bun agent de fosforilare este „acidul polifosforic" (Michelson, 1963). Astfel, tratarea 2′-3′-O-izopropiliden-citidinei sau uridinei, ori a analogilor lor sub formă de 2′,3′-O-benziliden-derivaţi, cu „acid polifosforic", dă naştere unui compus care prin hidroliză acidă suferă o degra-

dare a grupării sale polifosfatice. După îndepărtarea grupei protectoare se obțin, cu un randament bun, nucleotidele pirimidinice corespunzătoare (Michelson, 1958).

Sinteza nucleozid di- și trifosfaților. Primele sinteze ale nucleozid di- și trifosfaților au fost făcute de Baddiley și Todd (1947) și Baddiley și colab. (1949 *a*, *b*). Metodele de lucru întrebuințate în acest scop pot fi astfel redate schematic : hidroliza slab acidă a *2'*,*3'*-O-izopropiliden-adenozin-*5'*-dibenzil-fosfatului a dat naștere la adenozin-*5'*-benzil-fosfat. Sarea de argint a acestuia s-a tratat cu clorfosfatul de dibenzil, obținîndu-se adenozin-*5'*-tribenzil-pirofosfatul. Grupările benzilice au fost apoi îndepărtate prin hidrogenoliză catalitică, iar adenozin-*5'*-pirofosfatul s-a izolat sub formă de complex acridinic. Metoda a fost extinsă ulterior, întrebuințîndu-se procedeul de cuaternizare cu N-metil-morfolină pentru a îndepărta o grupă benzilică din adenozin-*5'*-pirofosfatul total esterificat. Adenozintrifosfatul (ATP) s-a obținut apoi după tratarea sării de argint a pirofosfatului cu clorfosfat de dibenzil, urmată de o hidrogenoliză a grupelor benzilice.

După o altă variantă a acestei metode, sarea de argint a adenozin-*5'*-fosfatului se tratează direct cu un exces de clorfosfat de dibenzil, iar produsul obținut este supus hidrogenolizei. Trifosfatul rezultat a fost identic cu ATP natural (Michelson și Todd, 1949). Diferitele etape ale sintezei ADP și ATP prin variantele mai sus amintite sînt redate în figura 16. Metodele de acest fel, considerate drept clasice, au fost înlocuite ulterior cu altele mai simple, mai rapide și, ceea ce este foarte important, mai eficiente.

Dintre acestea, cele care întrebuințează fosforoamidele ca agenți de fosforilare au un rol deosebit de important pentru sinteza nucleozid di- și trifosfaților adenozinei, guanozinei, citidinei și uracilului (Chambers și Khorana, 1958 ; Koerner și Varadarajan, 1960 ; Chambers și Moffat, 1958). Astfel, tratarea adenozin-*5'*-fosfatului cu trietil-amoniu-fosforoamida a dat naștere unui amestec de adenozin-*5'*-difosfat, trifosfat și adenozin-*5'*-polifosfat alături de nucleotide neintrate în reacție (Chambers și Khorana, 1958).

În aceste reacții, nucleozid-*5'*-fosforoamidele s-au dovedit însă a avea o mai mare utilitate decît alchil-derivații. Prepararea adenozin-*5'*-fosforoamidei necesară sintezei ADP și ATP s-a făcut din *2'*,*3'*-di-O-acetil-adenozină și fenil-fosfoclorură. Acestea, împreună, au dat nucleozid-*5'*-fenil-fosfoclorură, care, tratată cu amoniac, a condus la fosforoamida-*5'*-nucleozidei corespunzătoare. Grupările protectoare au fost apoi îndepărtate prin hidroliză alcalină (Chambers și Khorana, 1958).

Sinteza nucleozid-*5'*-fosforoamidelor s-a putut realiza și direct, sub formă de săruri de diciclohexil-guanidină sau amoniu, din nucleotide și amoniac, sub influența dicilohexil-carbodiimidei. În acest fel s-au obținut *5'*-fosforoamidele corespunzătoare celor patru nucleozide principale ale acidului ribonucleic. Pe lîngă avantajul mare pe care îl oferă simplitatea acestei

Scanned with OKEN Scanner

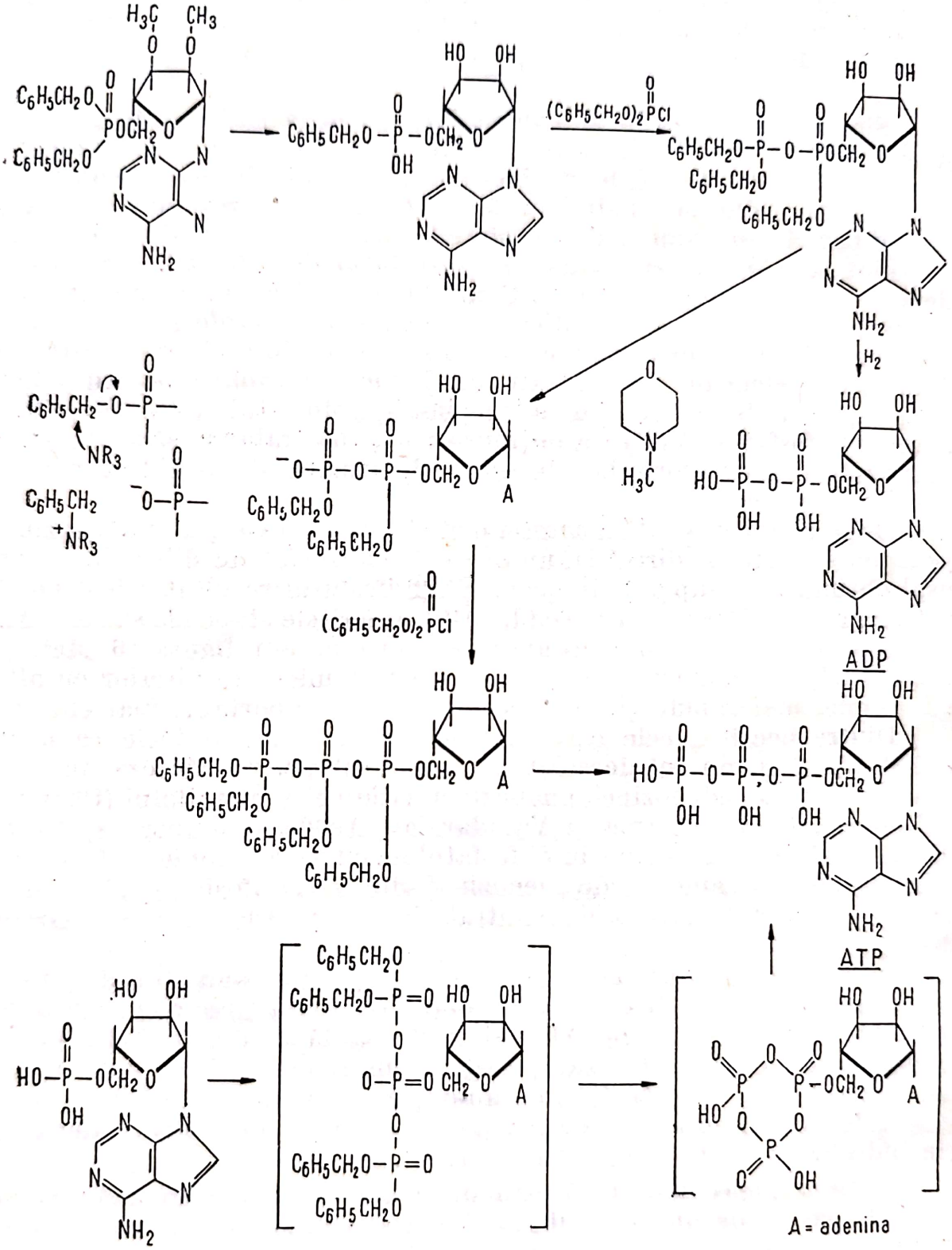


Fig. 16. — Sinteza adenozin-difosfatului (ADP) și a adenozin-trifosfatului (ATP) (după Michelson, 1963).

Scanned with OKEN Scanner

metode, ea a permis prepararea unui număr variat de nucleozid di- și trifosfați. În cazul particular al sintezei ADP și ATP cu ajutorul unor fosforoamide, reacțiile sînt prezentate schematic în figura 17.

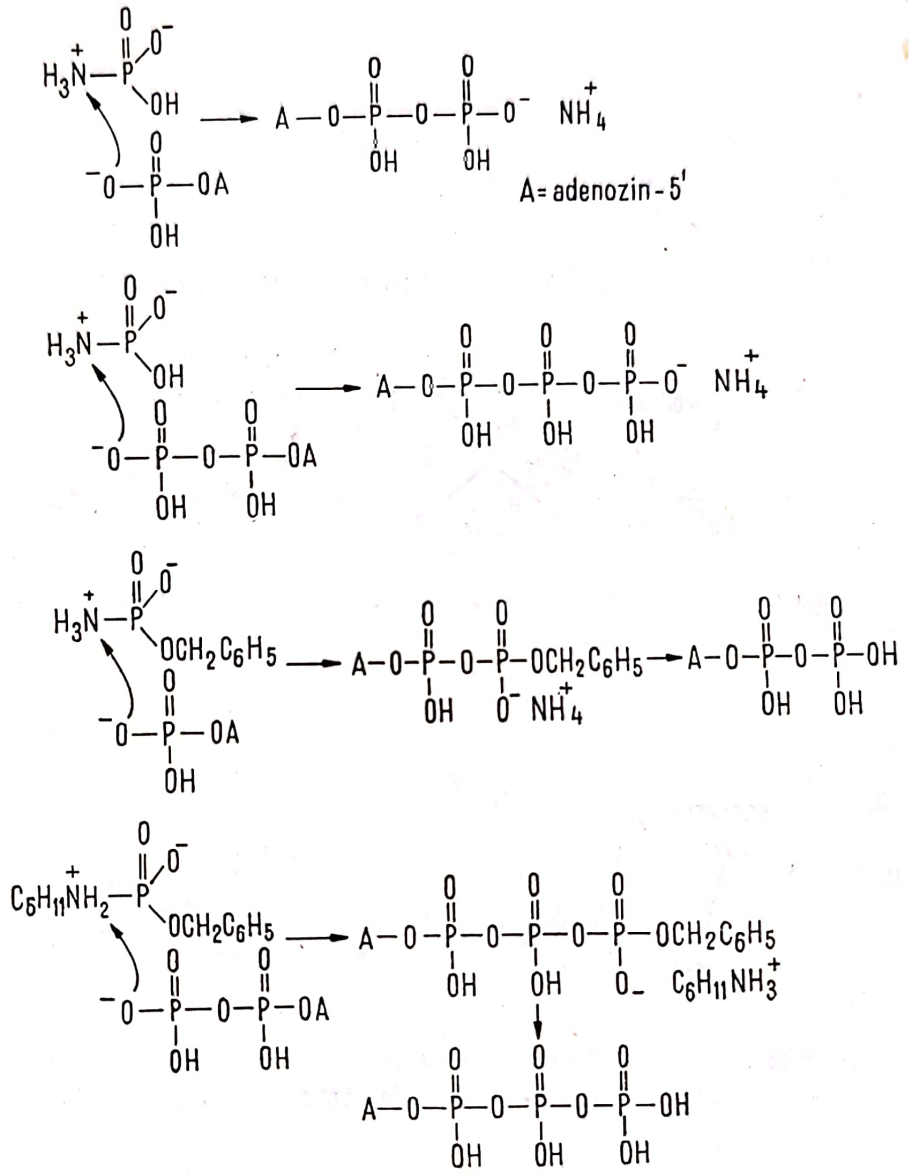


Fig. 17. — Sinteza adenozin-*5'*-difosfatului și a adenozin-*5'*-trifosfatului cu ajutorul unor fosforoamide (după Michelson, 1963).

Biosinteza nucleotidelor. Cunoștințele actuale asupra căilor de biosinteză a nucleotidelor purinice se datoresc în cea mai mare parte lucrărilor lui Buchanan și colaboratorilor săi : Warren și Buchanan (1957), Levenberg și Buchanan (1957), Lukens și Buchanan (1957) etc. Rezultatele obținute de aceștia, precum și ale altor cercetători care au lucrat în acest domeniu, au condus la concluzia că precursorul comun al celor două nucleotide purinice ale acidului ribonucleic, adenozin-*5'*-fosfatul și guanozin-*5'*-

fosfatul, este acidul inozinic. Acesta este sintetizat din glicocol, glutamină și fosforibozil-pirofosfat printr-un proces enzimatic complex, trecînd în glicinamid-ribozid, formil-glicinamid-ribotid, formil-glicinamidin-ribotid, 5′-aminoimidazol-ribotid, acid 5′-amino-4′-imidazol-carboxil-ribotidic, acid

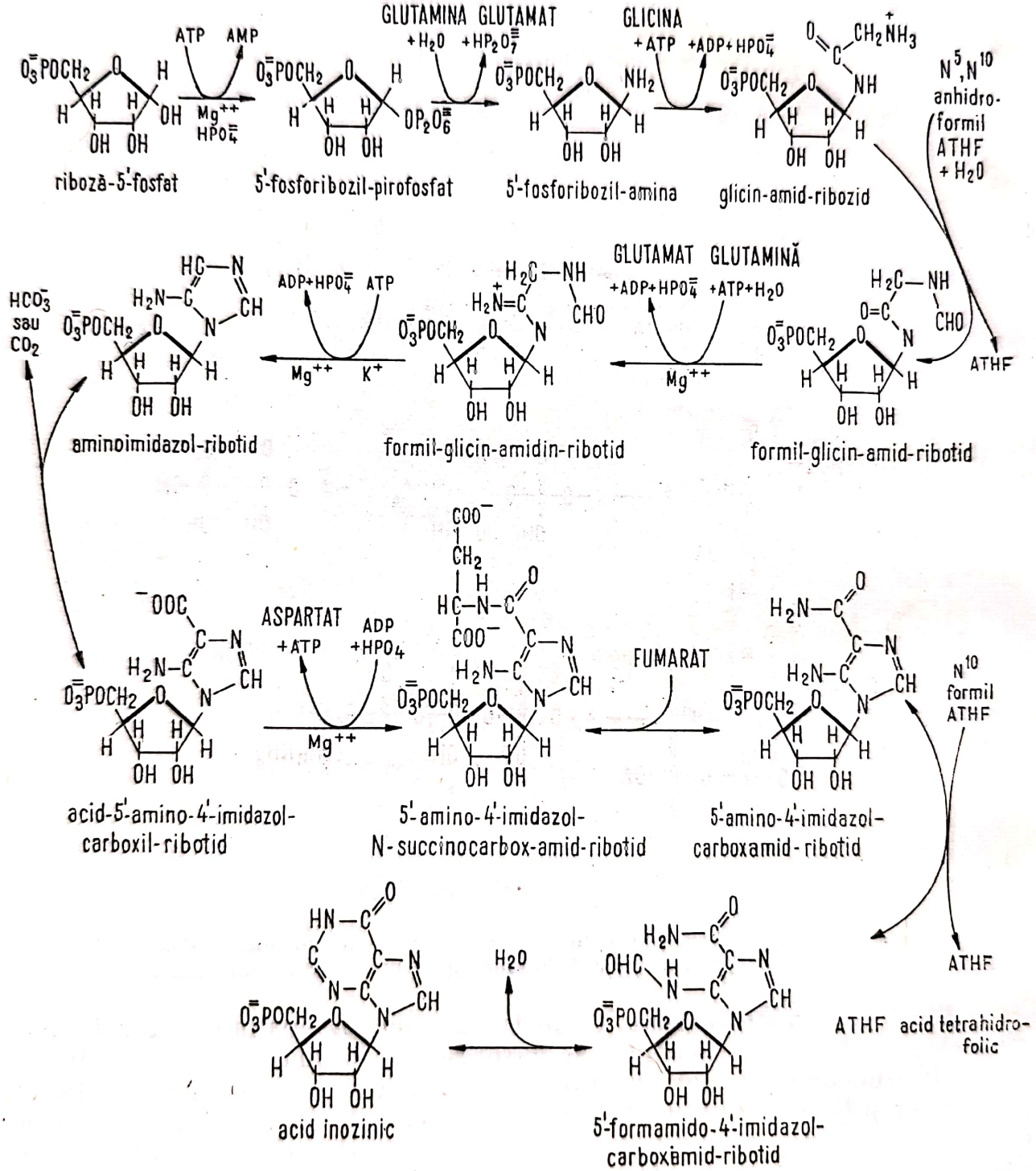


Fig. 18. — Biosinteza acidului inozinic (după Hartman și Buchanan, 1959).

5'-amino-*4'*-imidazol-N-succin-caboxamid-ribotid, *5'*-amino-*4'*-imidazolcarboxamid-ribotid și *5'*-formamido-*4'*-imidazol-carboxamid-ribotid (Hartmann și Buchanan, 1959; Buchanan, 1960). Toate etapele acestei sinteze sînt prezentate sub formă schematică în figura 18. Acidul inozinic sintetizat este ulterior transformat prin transaminare în acid adenilic. În această reacție participă acidul aspartic și GTP. Ca produs intermediar se formează acidul adenil-succinic, care este ulterior descompus în acid adelinic și acid fumaric.

Pe de altă parte, acidul inozinic poate fi oxidat în acid xantilic cu ajutorul difosfopiridin-nucleotidului (DPN). În continuare, acidul xantilic este aminat prin intermediul glutaminei și al ATP în acid guanilic (fig. 19).

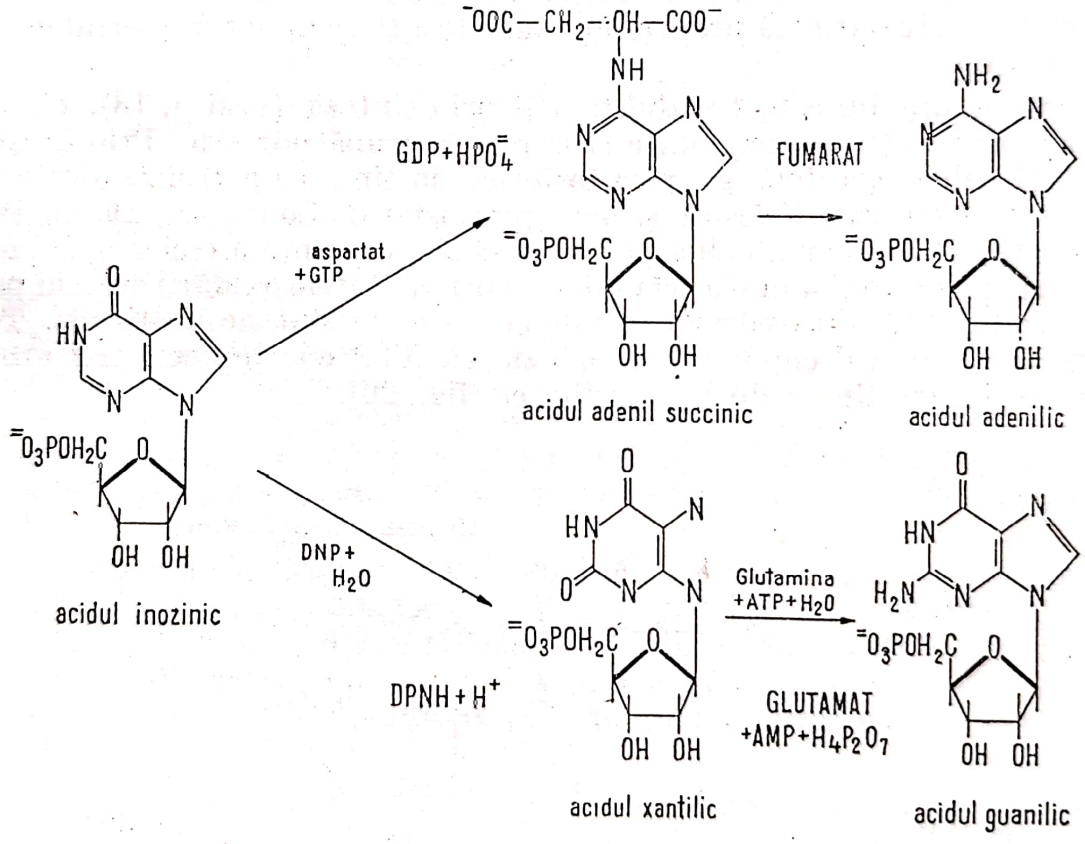


Fig. 19. — Biosinteza acizilor adenilic și guanilic din acidul inozinic (după Buchanan, 1960).

Sinteza nucleotidelor pirimidinice include patru etape principale (Reichard, 1955; Crosbie, 1960);

a) sinteza carbamil-fosfatului din acetil-glutamat, ATP și Mg^{++};

b) reacția carbamil-fosfatului cu CO_2 și glutamat pentru a da naștere la acidul ureidosuccinic;

c) formarea acidului dihidroorotic, oxidarea acestuia la acid orotic, care apoi, împreună cu fosforibozil-pirofosfatul, dă orotidin-*5'*-monofosfat;

d) sinteza acidului uridilic prin decarboxilarea oritidin-*5'*-monofosfatului. Nucleotidele citidilice iau naştere, probabil, prin aminarea nucleotidelor uridilice.

Biosinteza ribonucleozid-*5'*-difosfaţilor şi *5'*-trifosfaţilor. Sistemele de biosinteză ale acizilor ribonucleici, cunoscute pînă acum, pornesc sinteza fie de la difosfaţii, fie de la trifosfaţii ribonucleozidelor. Ei sînt precursorii imediaţi ai acidului ribonucleic şi au un rol important în toate procesele fundamentale din celule.

Dintre aceşti compuşi, acidul adenozin-trifosforic (ATP) ocupă o poziţie aparte datorită proprietăţii sale de a fi un donor universal de radicali fosforici.

Structura lui a fost stabilită atît prin sinteză (vezi p. 18), cît şi în urma unor reacţii de degradare şi titrare a grupărilor sale. Prin hidroliză acidă, el eliberează două grupări fosforice, în timp ce hidroliza alcalină dă naştere la adenozin-*5'*-fosfat şi acid pirofosforic (Lohmann, 1931). Pe de altă parte, titrarea cu alcali a pus în evidenţă prezenţa a trei grupări fosforice acide primare şi a uneia secundare, iar rezultatele oxidării cu acid periodic au indicat că hidroxilii ribozei de la $C_{2'}$ şi $C_{3'}$ sînt nesubstituiţi. Toate aceste rezultate au condus la concluzia că ATP conţine cele trei grupări fosforice legate liniar de C'_5 al ribozei (fig. 20).

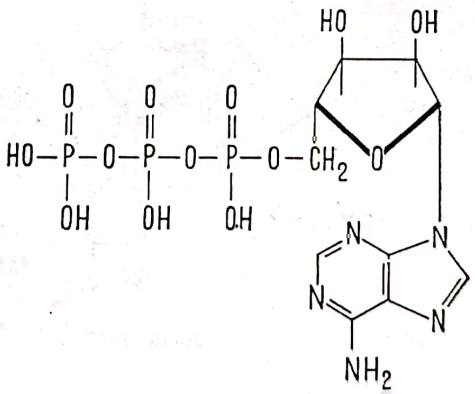


Fig. 20. — Acidul adenozin-trifosforic.

Adenilat-kinaza (miokinaza) este una dintre principalele enzime ce catalizează în mod reversibil reacţiile de fosforilare oxidativă a derivaţilor ATP:

$$ATP + AMP \rightleftharpoons 2ADP$$

Ceilalți ribonucleozid-difosfați iau naștere prin reacții similare din nucleozid-monofosfații corespunzători, în prezența monofosfat-kinazei :

$$ATP + GMP \rightleftharpoons ADP + GDP$$
$$ATP + CMP \rightleftharpoons ADP + CDP$$
$$ATP + UMP \rightleftharpoons ADP + UDP$$

În sfîrșit, difosfații astfel sintetizați suferă o nouă fosforilare sub influența nucleozid-difosfat-kinazei pînă la trifosfații respectivi (Smellie, 1963) :

$$ATP + GDP \rightleftharpoons ADP + GTP$$
$$ATP + CDP \rightleftharpoons ADP + CTP$$
$$ATP + UDP \rightleftharpoons ADP + UDP$$

Structura primară

Organizarea intracatenară (structura primară) a acizilor ribonucleici a devenit astăzi parțial cunoscută datorită interpretării rezultatelor variatelor metode de hidroliză enzimatică și chimică efectuate asupra acestor compuși. La elucidarea structurii primare a acizilor ribonucleici, o contribuție de seamă au avut-o și lucrările care au stabilit, prin sinteză și degradare, structura nucleotidelor simple.

Greutatea moleculară mare a acizilor ribonucleici, ca și rezultatele uneori complexe ale hidrolizelor efectuate asupra lor au determinat ca, în ansamblu, cunoștințele referitoare la structura lor primară să progreseze foarte încet. Într-adevăr, stabilirea exactă a modului de înlănțuire a aproximativ 6 000 de nucleotide cît conține un acid ribonucleic înalt polimerizat este o sarcină dificilă.

Problemele principale care se pun în această operație și a căror soluționare este complet rezolvată doar în cazul unui singur acid ribonucleic (ARN-*S*, specific alaninei) sînt acelea legate de :

A. cunoașterea naturii și a poziției legăturilor internucleotidice ;

B. determinarea compoziției și a succesiunii (secvenței) nucleotidelor în interiorul lanțului macromolecular.

Natura legăturilor internucleotidice. Titrarea electrometrică a mono-ribonucleotidelor, efectuată de Levene și Simms (1926), i-a condus la

concluzia că, în interiorul macromoleculei de ARN, nucleotidele sînt legate între ele prin legături fosfodiesterice, după cum se vede din schema de mai jos :

Bază — Riboză — PO (OH)
|
Bază — Riboză — PO (OH)
|
Bază — Riboză — PO (OH).

Formularea aceasta, în care fiecare moleculă de riboză a unui nucleotid are ataşată de ea una dintre cele patru baze azotate (adenina, guanina, citozina sau uracilul), iar fiecare grupare fosfatică a unui nucleotid se leagă de două riboze din două nucleotide învecinate, a rămas şi astăzi unanim aceeptată. Cercetările ulterioare au avut meritul de a preciza poziţia atomilor de carbon ai ribozei la care are loc esterificarea. Rezultatele hidrolizelor efectuate asupra acizilor ribonucleici, care au permis evidenţierea şi izolarea nucleotidelor esterificate la carbonii $C_{2'}$ $C_{3'}$ şi $C_{5'}$, precum şi cercetări efectuate asupra structurii nucleotidelor au dat posibilitatea lui

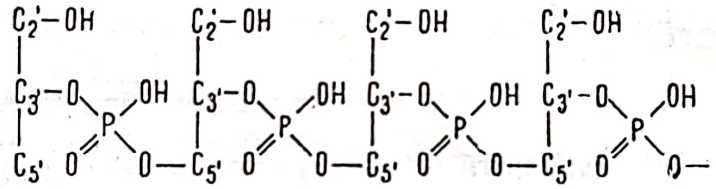


Fig. 21. — Structura primară a acizilor ribonucleici (după Brown şi Todd, 1955).

Brown şi Todd (1952, 1955), să formuleze structura primară a acizilor ribonucleici (fig. 21), conform căreia nucleotidele sînt unite între ele prin legături *3',5'*-fosfodiesterice.

Argumente în favoarea existenţei legăturilor 3'-5' internucleotidice în acizii ribonucleici. Hidroliza unor acizi ribonucleici, realizată de Volkin şi Cohn (1952) cu nuclează din splină, a permis să se evidenţieze, în produşii de hidroliză, prezenţa nucleotidelor purinice şi pirimidinice esterificate în poziţia $C_{3'}$ a ribozei. Întrebuinţînd aceeaşi enzimă, însă cu un grad de puritate mai avansat, Heppel şi Hilmoe (1953) au reuşit să degradeze acizii ribonucleici şi unele oligonucleotide pînă la mononucleotide. Izolarea dintre acestea a acidului *3'*-adenilic şi *3'*-guanilic i-a determinat pe autorii menţionaţi să ajungă la concluzia că, în acizii ribonucleici intacţi, nucleotidele purinice sînt legate în poziţia $C_{3'}$.

Aceste observaţii, coroborate cu cele obţinute de Brown şi Todd (1953) cu ocazia studiului acţiunii ribonucleazei asupra unor esteri ai nucleotidelor, cînd s-a remarcat formarea preferenţială a derivaţilor esterificaţi la $C_{3'}$, au permis să se stabilească că în acizii ribonucleici nucleotidele se leagă în poziţia $C_{3'}$ şi nu la $C_{2'}$ a reziduului nucleozidic.

Pe de altă parte, acidul ribonucleic, tratat cu ribonuclează și apoi cu fosfatază intestinală și arseniat (prezența acestuia din urmă este necesară pentru a inhiba acțiunea fosfomonoesterazei), a permis izolarea din hidrolizat a acidului *5'*-adenilic, *5'*-guanilic, *5'*-citidilic și *5'*-uridilic (Cohn și Volkin, 1951). Totodată, diesteraza din veninul de șarpe a determinat eliberarea nucleozid-*5'*-fosfaților din acizii ribonucleici din drojdie sau ficat de vițel într-o proporție mai mare de 60% (Cohn și Volkin, 1952). De aici s-a dedus că poziția $C_{5'}$ are o mare importanță în realizarea legăturilor internucleotidice.

După cum arată Brown și Todd (1955), considerarea legăturilor *3'-5'* internucleotidice drept legături principale ale acizilor ribonucleici a fost motivată și de analogia cu acizii dezoxiribonucleici, care prezintă același tip de legături. În cazul acizilor dezoxiribonucleici, legăturile *2'-5'* internucleotidice nu se pot forma datorită unor cauze de ordin structural.

Dovezi în favoarea structurii ramificate a acizilor ribonucleici. Hidrolizele chimice ale acizilor ribonucleici nu permit a se stabili exact dacă lanțul macromoleculelor este liniar sau ramificat. Datele existente obținute prin aceste metode pot fi în egală măsură interpretate și în favoarea existenței legăturilor de ramificare. De altfel, Brown și Todd (1952), în lucrarea în care au formulat structura generală a acizilor ribonucleici, nu au exclus posibilitatea ca în afara legăturilor internucleotidice principale $C_{3'}$-$C_{5'}$ să existe și legături internucleotidice de ramificare a lanțului macromolecular.

Întrebuințarea unor tehnici speciale de titrare electrometrică (Fletcher și colab., 1944), cît și complexarea cu unii coloranți ai acizilor ribonucleici (Cavalieri și colab., 1951) au determinat pe unii cercetători să susțină existența unor legături de ramificație în molecula de acid ribonucleic.

Cele mai evidente argumente în favoarea structurii ramificate a acizilor ribonucleici au fost aduse însă cu ajutorul unor hidrolize enzimatice. Astfel, Volkin și Cohn (1953), hidrolizînd acidul ribonucleic cu venin de șarpe, care conține fosforodiesteraze și *5'*-nucleotidaze, au dovedit că în urma acestui tratament se eliberează o cantitate mare de fosfor anorganic. Totodată, ei au putut pune în evidență, în hidrolizat, existența citidin-difosfatului și a uridin-difosfatului într-o cantitate corespunzătoare cu 30% din totalul nucleotidelor pirimidinice. Cantitatea mare de fosfat anorganic a fost generată de prezența *5'*-nucleotidazei. Hidroliza acizilor ribonucleici cu preparate enzimatice din veninul de șarpe din care s-a îndepărtat *5'*-nucleotidaza a determinat apariția în hidrolizat a unei cantități mici de fosfor anorganic. În schimb s-a obținut o cantitate mare de nucleozid-*5'*-fosfați, nucleozid-difosfați pirimidinici, unele nucleozide purinice și aproximativ 10% nucleotide pirimidinice. Difosfații izolați s-au dovedit a fi amestecuri de citidin-*2'*, *5'* și citidin -*3'*, *5'*-difosfați, precum și uridin-difosfații corespunzători.

Rezultatele obținute au fost interpretate de Volkin și Cohn (1953) prin prisma structurii ramificate a acizilor ribonucleici. Într-adevăr, consi-

Scanned with OKEN Scanner

derînd structura acizilor ribonucleici identică cu cea reprezentată în figura 22, eliberarea produşilor mai sus-amintiţi a putut fi explicată.

Fosfodiesteraza hidrolizează specific legăturile internucleotidice C_3-O-P menţionate în figura 22 prin liniile întrerupte. În urma acţiunii ei,

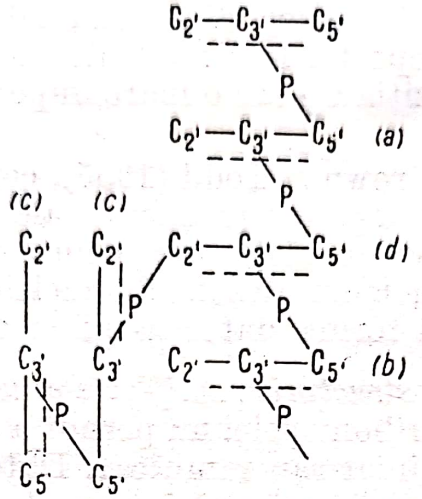


Fig. 22. — Structura primară ramificată a acizilor ribonucleici propusă de Volkin şi Cohn (1953).

se eliberează nucleozid-5′-fosfaţii notaţi cu literele *a*, *b* şi *c*. În acelaşi timp, nucleozid-difosfaţii provin din nucleotidele care sînt ramificate (*d*), iar nucleozidele purinice din nucleotidul terminal din ramificaţie (*c*). Întrucît cantitatea nucleozidelor purinice (*c*) a fost egală cu aceea a nucleoziddifosfaţilor, Volkin şi Cohn (1953) au considerat că nucleotidul din punctul de ramificaţie este de natură pirimidinică.

Compoziţia şi secvenţa nucleotidelor în lanţul macromolecular. Una dintre cele mai dificile probleme care s-a pus în faţa cercetătorilor care s-au ocupat de structura acizilor nucleici a fost aceea de a cunoaşte compoziţia şi ordinea în care sînt distribuite nucleotidele în lanţul macromolecular. Există o anumită regularitate în repartizarea diferitelor nucleotide în molecula acidului nucleic sau ele sînt repartizate la întîmplare în lanţul polinucleotidic?

O primă încercare de a răspunde la această întrebare poate fi considerată formularea structurii tetranucleotidice a acizilor nucleici făcută de Levene şi Bass (1931).

Structura tetranucleotidică propusă de Levene are în momentul de faţă doar o valoare istorică. Nu trebuie însă neglijat faptul că ea a avut meritul de a oferi o primă imagine asupra structurii acestor compuşi macromoleculari şi de a fi stimulat cercetările ulterioare care au stabilit compoziţia şi implicit rolul lor. La baza acestei formulări stă principiul conform

căruia monomerul, care se repetă de *n* ori în molecula acidului nucleic, este constituit din patru nucleotide (două purinice și două pirimidinice), așezate în așa fel încît un nucleotid purinic este întotdeauna urmat de unul pirimidinic. Totodată, cele patru nucleotide principale ale acizilor nucleici, care în cazul ARN sînt acizii adenilic, guanilic, uridilic și citidilic, se găsesc în proporții echimoleculare. Formularea tetranucleotidică, care respectă o distribuție rigidă a nucleotidelor în lanț, nu a putut însă explica o serie de observații care s-au acumulat în timp, privind compoziția, specificitatea și rolul biologic ai acizilor nucleici. Progresele realizate de metodele fizice și chimice de analiză, dintre care merită să fie amintite cele din domeniul cromatografiei pe hîrtie și coloană și ale electroforezei, au dovedit neconcordanța dintre datele experimentale obținute pentru concentrația nucleotidelor acizilor nucleici și valorile teoretice deduse pe baza structurii tetranucleotidice.

Determinarea compoziției în nucleotide a acizilor nucleici de diferite proveniențe a dovedit că, în marea majoritate a cazurilor, nucleotidele se găsesc în proporții mult deosebite față de acelea care rezultă teoretic conform structurii tetranucleotidice (tabelul 1). Astfel, în timp ce acizii ribonucleici extrași din țesuturi animale (splină, timus, ficat etc.) au cantitatea de acid guanilic și citidilic mai mare decît aceea de acid adenilic și uridilic, acizii ribonucleici virali prezintă un aspect total diferit. În cazul acestora din urmă, valoarea relativă a acidului guanilic este mai mică decît a acidului adenilic, iar acidul citidilic are valori apropiate de cele ale acidului uridilic.

Datele prezentate mai sus, precum și acelea care au scos în evidență existența unor nucleotide rare, deosebite de cele patru principale cunoscute, au demonstrat că ARN de diferite proveniențe au o compoziție specifică în nucleotide și că ei nu pot fi considerați în nici un caz ca macromolecule constituite din secvențe rigide și limitate de nucleotide.

Pînă în prezent s-au făcut numeroase tentative de a descifra ordinea exactă a nucleotidelor în interiorul lanțului macromolecular. Dintre acestea, merită să fie amintite lucrările lui Staehelin (1961 și 1962), care a analizat mono-, di- și trinucleotidele rezultate în urma acțiunii ribonucleazei pancreatice asupra unor ARN. Acest autor a remarcat o bună concordanță între rezultatele experimentale și cele calculate teoretic (excepție au făcut doar valorile pentru trinucleotidele izomere Gp Ap Cp și ApGpCp, considerînd că nucleotidele sînt distribuite întîmplător în interiorul lanțului. De exemplu, în cazul ARN solubil izolat din drojdie, proporția găsită de dinucleotide (din nucleotidele totale) a fost : AC = 5,2%; AU = 4,3% și GC = 8,3%. Aceste valori sînt apropiate de acele deduse teoretic din distribuția lor întîmplătoare în interiorul lanțului, și anume : 5,8%, 4,0% și, respectiv, 8,7%. Valori similare au fost obținute și cu un ARN-*S* extras din ficat (Staehelin, 1962). Experiențe similare s-au efectuat cu ARN extrași din VMT și din virusul mozaicului galben al napului. Cei doi ARN virali au compoziția în nucleotide diferite. În timp ce ARN din VMT

conţine puţin acid citidilic, celălalt virus conţine acest nucleotid în cantităţi mari. Şi în aceste două cazuri Staehelin (1961) a găsit o concordanţă satisfăcătoare între distribuţia calculată şi rezultatele experimentale.

Tabelul 1

Compoziţia în nucleotide a unor ARN de diferite origini

Sursa	Acidul adenilic	Acidul guanilic	Acidul citidilic	Acidul uridilic	Raportul purine/pirimidine	$\frac{G+U}{A+C}$	$\frac{G+C}{A+U}$	Referinţa
Splină-viţel	10	19,7	17,7	8,6	1,13	1,02	2,01	Volkin-Carter (1954)
Timus-viţel	10	23,8	13,9	6,5	1,65	1,27	2,28	,,
Ficat-viţel	10	17,9	14,9	8,4	1,20	1,06	1,78	,,
Ficat-iepure	10	16,9	14,6	10,3	1,08	1,11	1,55	Crosbie şi colab. (1953)
Ficat-şobolan	10	17,6	14,3	10,8	1,10	1,17	1,53	,,
Nuclei ficat-şobolan	10	12,7	14,6	12,2	0,84	1,01	1,23	Elson-Chargaff (1952)
Ficat-şoarece	10	16,2	13,3	8,1	1,24	1,04	1,62	Popa-Cruceanu (1966)
Mitocondrii ficat-şobolan	10	16,9	15,1	11,0	1,03	1,11	1,52	Crosbie şi colab. (1952)
Microzomi-şobolan	10	17,9	17,9	9,9	1,03	1,03	1,76	Elson-Chargaff (1952)
Celule KB	10	10,6	7,3	2,4	2,11	0,75	1,44	Popa-Cruceanu (1966)
Drojdie de bere	10	10,4	4,2	4,6	1,08	1,04	1,00	Khouvine-Robichon (1952)
Ribozomi (*E. coli*)	10	14,3	8,9	9,0	1,35	1,22	1,23	Katz-Comb (1963)
ARN-*S* (*E. coli*)	10	15,8	14,3	10,8	1,02	1,09	1,44	Zubay (1962)
Escherichia coli (totali)	10	10,2	8,5	8,3	1,20	1,00	1,02	Elson-Chargaff (1954)
ARN-*S* specific fenilalaninei	10	16,6	13,2	9,8	1,12	1,09	1,46	Hartmann-Coy (1961)
ARN-*S* ficat-şoarece	10	13,8	12,0	5,6	1,27	0,90	1,69	Popa-Cruceanu (1966)
Aspergillus niger	10	12,0	10,0	8,0	1,23	1,00	1,23	Uryson Belozersky (1959)
Virusul mozaicului tutunului	10	8,5	6,2	8,8	1,24	1,07	0,78	Knight (1952)
Virusul polio	10	8,4	7,7	8,9	1,11	0,98	0,85	Schaffer şi colab. (1960)
Virusul encefalomiocarditei	10	8,6	8,5	9,5	1,03	0,98	0,88	Faulkner şi colab. (1961)
Virusul febrei aftoase	10	9,2	10,7	8,4	1,00	0,85	1,08	Bachrach (1965)

Experienţele de acest tip au arătat că repartizarea nucleotidelor în interiorul lanţului macromolecular pare a fi întîmplătoare, fără a se reuşi să se pună în evidenţă o anumită regularitate a aranjării lor. Trebuie menţionat însă faptul că în aceste experienţe s-a urmărit distribuţia unor secvenţe mici de nucleotide în moleculele de ARN şi nu a nucleotidelor individuale.

Secvenţa nucleotidelor în ARN-*S* specific alaninei. După cum era şi firesc, primul ARN în care s-a determinat secvenţa completă a nucleotide-

lor a fost un ARN-*S*, a cărui moleculă este, după cum se știe, cea mai mică dintre ARN biologic activi. Cu toate că ARN-*S* conțin numai aproximativ 70 de nucleotide, în timp ce cei virali aproximativ 6 000, performanța colectivului de cercetători condus de Robert W. Holley (1965) rămîne o realizare de mare valoare științifică.

Determinarea structurii ARN-*S*, specific alaninei, a fost facilitată, în primul rînd, de descoperirea acțiunii de hidroliză selectivă a ribonucleazei T_1 din takadiastază și, în al doilea rînd, de dezvoltarea metodelor de analiză cromatografică, dintre care tehnica de cromatografie pe coloane lungi de DEAE-celuloză, cu întrebuințarea ureii 7 M ca eluant, a avut un rol hotărîtor.

Determinarea structurii acestui ARN a necesitat rezolvarea a două etape de lucru principale : a) fragmentarea moleculei cu ajutorul ribonucleazei pancreatice și a ribonucleazei T_1 din takadiastază, urmată de analiza cromatografică și chimică a produșilor rezultați, și b) reconstituirea teoretică a moleculei întregi pe baza rezultatelor analizei fragmentelor obținute.

În urma acțiunii ribonucleazei pancreatice, ARN a fost scindat în 39 de fragmente, care s-au putut clasa în 19 categorii. Pe de altă parte, ribonucleaza T_1 din takadiastază a fragmentat același ARN în 29 de porțiuni. Cunoscîndu-se mecanismul de acțiune al celor două enzime, s-a încercat apoi „reconstituirea" din fragmente, a moleculei. Această operație a fost într-o mare măsură ajutată de descoperirea că, la 0° și în funcție de condițiile experimentale, ribonucleaza din takadiastaza T_1 scindează molecula de ARN în diferite fragmente mari. Astfel, în urma unui tratament de scurtă durată, molecula de ARN a fost desfăcută în două fragmente, în timp ce, după o oră, tot la 0° C s-au obținut patru fragmente mai mici (*a*, *b*, *c* și *d*, fig. 23). Fragmentele notate cu *e* pînă la *i* au fost puse în evidență tot în urma unor hidrolize limitate, urmate de o recromatografiere a lor.

Rezultatele astfel obținute alături de cele deduse din hidrolizele totale cu ribonucleazele amintite au permis lui Holley și colab. (1965) să stabilească pentru prima dată secvența completă a unui ARN.

Cunoașterea structurii ARN-*S*, specific alaninei, ridică cîteva probleme relativ la structura primară a ARN. În primul rînd, formula stabilită confirmă datele anterioare privind structura monocatenară a unui ARN.

Rezultatele hidrolizelor enzimatice (cunoscîndu-se mecanismul lor de acțiune) efectuate cu această ocazie se pot interpreta de asemenea ca argumente în favoarea existenței legăturilor *3'-5'* internucleotidice drept legături principale și totodată unice în acest acid ribonucleic. Există deci toate motivele să se considere că și în ceilalți ARN-*S* (dacă nu în toți acizii ribonucleici) legăturile internucleotidice sînt de tipul *3'-5'*.

În al doilea rînd, merită să fie remarcată existența unui număr mare de nucleotide rare în compoziția acestui ARN-*S*. Se observă astfel prezența nucleotidelor ce conțin dimetil-guanină, dihidrouracil, inozină, metil-guanină, metil-inozină, timină și pseudouridină alături de nucleotidele prin-

Scanned with OKEN Scanner

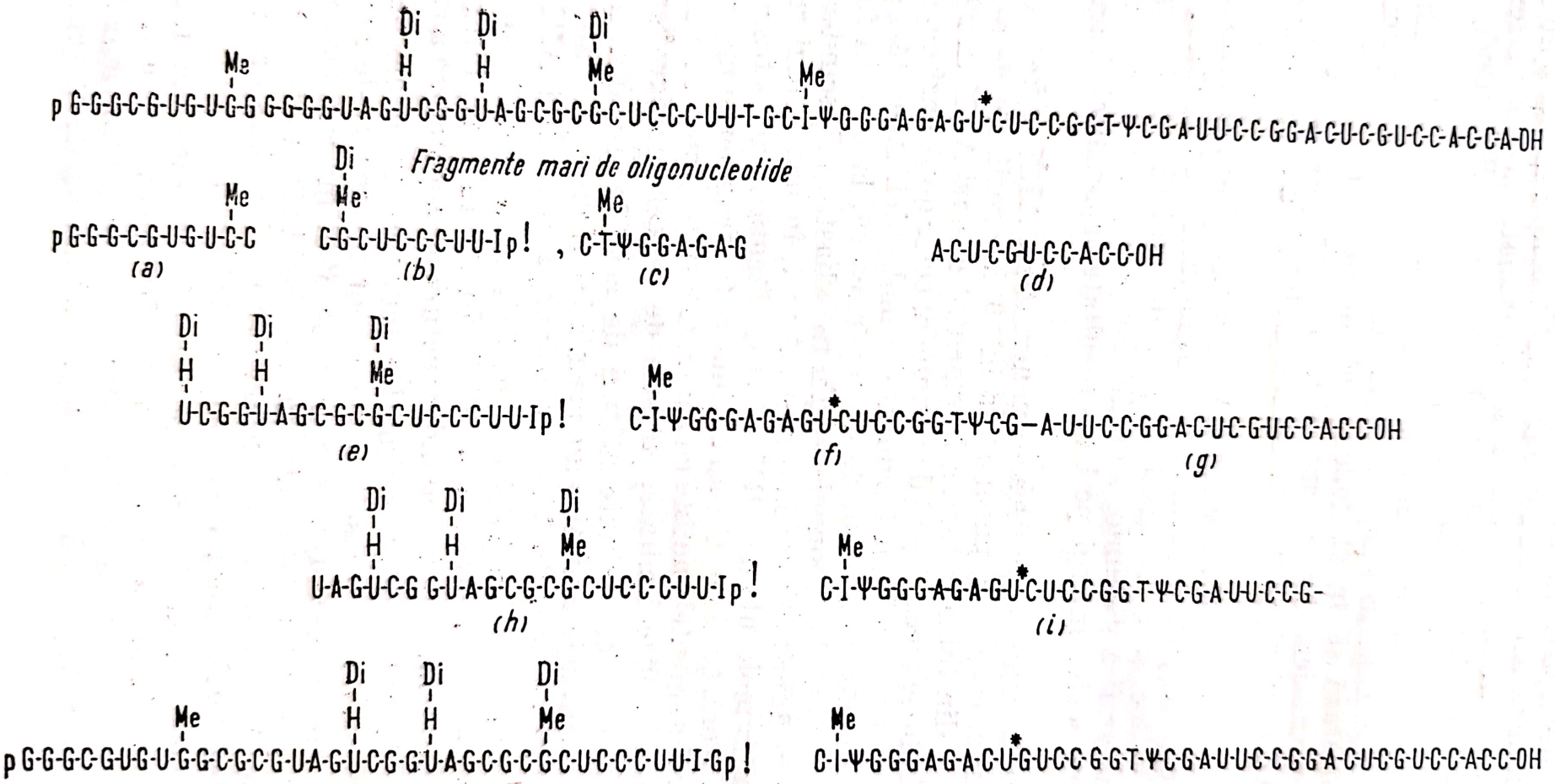


Fig. 23. — Structura primară a ARN-*S*, specific transferului de alanină (după Holley şi colab., 1965).

cipale care au adenină, guanină, citozină și uracil. În ceea ce privește distribuția nucleotidelor rare, în lanțul molecular nu se observă o anumită regularitate în aranjarea lor, în diferitele puncte ale moleculei.

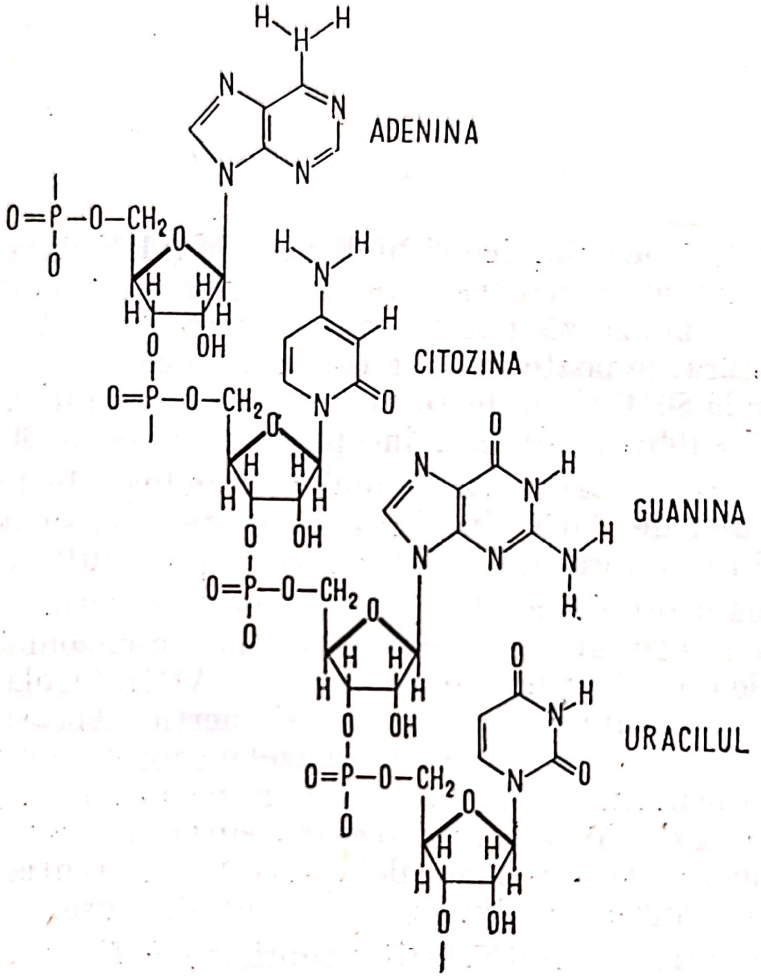


Fig. 24. — Reprezentarea schematică a structurii primare a unui fragment de moleculă de acid ribonucleic.

În lumina celor prezentate, se poate deci considera că acizii ribonucleici sînt constituiți din lanțuri monocatenare liniare, în care mononucleotidele sînt înlănțuite prin legături *3'*, *5'*-fosfodiesterice. Existența unor ramificări în molecula ARN nu este total exclusă; ea se bazează pe unele rezultate obținute cu ajutorul titrării electrometrice, pe prezența în produșii de hidroliză a acizilor ribonucleici a nucleotidelor esterificate în poziția C_2 și pe unele studii cinetice ale hidrolizei. Gradul de ramificare a ARN nu a fost stabilit. Din datele existente se poate deduce însă că, în cazul în care ramificarea există, ea nu poate fi prea avansată. Ceea ce este important este faptul că ramificarea nu afectează nici structura generală și nici natura legăturilor internucleotidice. Din această cauză, în cursul expunerii noastre vom întrebuința pentru structura primară a molculelor de ARN formula schematică reprezentată în figura 24, în care, legăturile internucleo-

tidice sînt de tipul *3′—5′*. În ceea ce priveşte succesiunea nucleotidelor admisă în figura 24, trebuie precizat că ea este arbitrar aleasă. În realitate, ARN pot prezenta oricare succesiune posibilă a nucleotidelor lor.

Structura secundară

Proprietăţile fizico-chimice şi biologice ale ARN dovedesc că aceste macromolecule sînt mult mai instabile decît cele ale acidului dezoxiribonucleic. Dacă se analizează numai comportarea celor doi acizi nucleici faţă de temperatură, se poate observa că, în timp ce majoritatea ADN pot fi încălziţi chiar la 80° C timp de 10 min fără să-şi modifice structura, cei mai mulţi ARN suferă modificări începînd chiar de la 30°C.

Totodată s-a remarcat că schimbările induse de temperatură în structura moleculei de ARN sînt în mare parte (sau chiar total) reversibile, cele produse asupra ADN sînt de cele mai multe ori ireversibile.

Stabilitatea deosebită a ADN este atribuită structurii sale secundare specifice, adică a configuraţiei moleculare dublu-elicoidale (Watson şi Crick, 1953). Cele două lanţuri ale moleculei de ADN, încolăcite sub formă de helix, îi conferă o anumită rigiditate şi inerţie. Această conformaţie specială permite o interacţiune maximă a bazelor azotate complimentare din cele două lanţuri prin intermediul legăturilor de hidrogen şi a forţelor de legătură de tip van der Waals. Din această cauză, atît agenţii fizici, cît şi cei chimici acţionează asupra moleculei de ADN preferenţial numai atunci cînd legăturile de hidrogen, dintre baze, sînt distruse.

În ceea ce priveşte ARN, atît proprietăţile fizico-chimice, cît şi funcţiile biologice presupun existenţa unui aranjament intramolecular specific al macromoleculei, adică o anumită structură secundară.

Spre deosebire de ADN, pe care datele experimentale îi prezintă ca macromolecule bicatenare organizate sub formă dublu-elicoidală, în majoritatea cazurilor, molecula de ARN prezintă proprietăţile polinucleotidelor monocatenare, cu un anumit grad de organizare intramoleculară.

În ultimul timp însă, o serie de cercetători au reuşit să demonstreze că în unele virusuri, precum şi în unele celule infectate cu virusuri ce conţin ARN monocatenar se pot pune în evidenţă molecule de ARN bicatenare.

Cele mai adecvate metode de cercetare întrebuinţate pentru determinarea structurii secundare a ARN s-au dovedit a fi : *1*) studiul variaţiei densităţii optice în funcţie de temperatură (tranziţia termică) ; *2*) determinarea rotaţiei optice specifice în funcţie de temperatură ; *3*) activitatea hidrolitică a ribonucleazei ; *4*) reacţia cu formaldehida şi ureea ; *5*) pro-

prietățile acido-bazice. În cele ce urmează vom prezenta rezultatele experimentale care au condus la cunoașterea organizării intra și intercatenară a moleculelor de ARN.

Tranziția termică a ARN. Dacă se urmărește valoarea absorbției în ultraviolet a unei soluții de acid nucleic în timpul încălzirii, se observă că absorbția la 260 mμ variază în funcție de temperatură, după o curbă care este caracteristică produsului studiat. În același timp însă, aspectul curbei depinde și de natura solventului în care este dizolvat acidul nucleic.

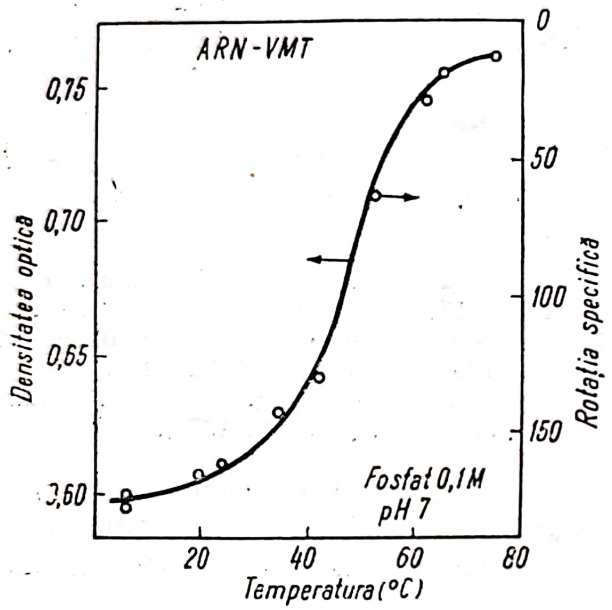


Fig. 25. — Variația densității optice (linia continuă) și a rotației specifice (cercurile), în cazul soluției de ARN din VMT, în funcție de temperatură (după Doty și colab., 1959).

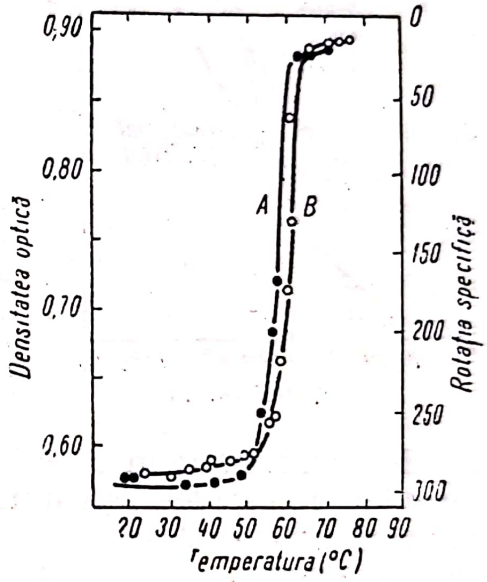


Fig. 26. — Variația rotației specifice(*A*) și a densității optice (*B*) a complexului dublu spiralat de poli-A + poli-U, în funcție de temperatură, în soluția de NaCl 0,15 M + citrat 0,015 M, pH 7 (după Doty și colab., 1959).

De obicei, un ARN nativ — înțelegînd prin aceasta un produs care nu a suferit alterări structurale în cursul sau după extracție — își mărește absorbanța la 260 mμ începînd de la aproximativ 30°C pînă la aproximativ 90°C (fig. 25). Ribopolinucleotidele sintetice de tipul complexului poli-A + poli-U conduc, în schimb, la obținerea unei curbe cu un aspect cu totul diferit. În acest caz, valoarea absorbanței rămîne relativ constantă în timpul încălzirii pînă la aproximativ 50°C. După depășirea acestui punct, se înregistrează o creștere bruscă a absorbanței, a cărei valoare maximă se obține, de obicei, în următoarele 10° de încălzire (fig. 26). Care este explicația acestor comportări diferite?

Cercetările inițiate de Doty și colab. (1959) au demonstrat că efectul hipercromic, obținut sub influența temperaturii asupra polinucleotidelor,

se datorește tranziției lor dintr-o stare ordonată într-una dezordonată. După aspectul curbei rezultate — care a primit denumirea de „curba de tranziție termică" — se poate aprecia gradul de ordonare sau proporția zonelor spiralate existente în moleculele de acizi nucleici. Prin urmare, după cum arată autorii citați, rezultatul analizei spectrofotometrice a unei

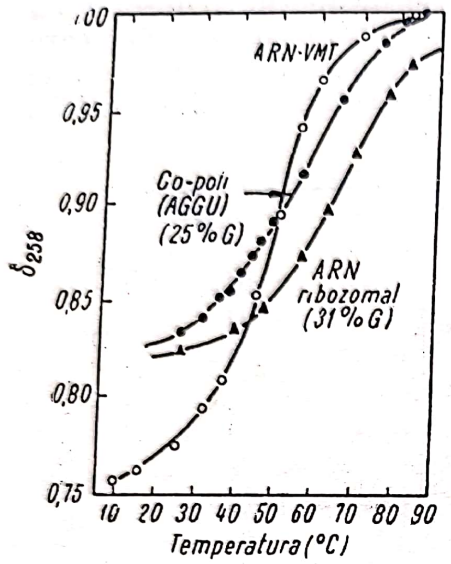


Fig. 27. — Variația absorbanței (la 258 mμ) a soluțiilor de ARN din VMT, ARN ribozomal din ficatul de vițel și copolimerului sintetic ACGU în funcție de temperatură, în tampon fosfat 0,1 M, pH 7; în paranteze conținutul în guanină al compușilor studiați (după Doty și colab., 1959).

soluții de acid nucleic în cursul încălzirii poate oglindi direct tranziția pe care o suferă moleculele sale din starea ordonată (helix) în cea înghemuită neorganizat (ghem). Această schimbare a structurii a fost numită „tranziția helix — ghem".

După cum se observă din figurile 25 și 26, cei doi produși prezintă curba de tranziție total diferită. În primul caz, creșterea absorbanței se face după o curbă cu o pantă lentă, repartizată într-o zonă largă de temperatură, în timp ce în al doilea caz panta este bruscă, creșterea absorbanței fiind limitată pe o zonă restrînsă de temperatură. Aspectul diferit al celor două curbe de tranziție termică se datorește organizării moleculare diferite a celor doi compuși. În primul caz, ARN își mărește valoarea absorbanței simultan cu ridicarea temperaturii, deoarece moleculele sale sînt constituite dintr-un singur lanț în care numai anumite zone sînt ordonate, probabil, sub formă de dublu helix. Se consideră azi că zonele ordonate se realizează în urma interacțiunii bazelor complimentare prin intermediul legăturilor de hidrogen din diferite secțiuni ale aceluiași lanț. Lungimea dublelor elice astfel rezultate nu pare a fi prea mare. Această presupunere este justificată de observarea valorii absorbanței, care crește cu valori mici în timpul încălzirii, ceea ce corespunde cu „topirea" succesivă a unor zone dublu-elicoidale relativ scurte. Marea majoritate a ARN înalt polimerizați (virali, sintetici și ribozomali) prezintă o curbă de tranziție termică asemănătoare (fig. 27). Această curbă este caracteristică macromoleculelor monocatenare, care au un anumit grad de organizare intramoleculară.

Scanned with OKEN Scanner

Spre deosebire de acești ARN, complexul poli-A + poli-U își mărește brusc absorbanța într-o zonă restrînsă de temperatură, în mod asemănător cu ADN dublu-elicoidal. Aceasta demonstrează că între structura secundară a celor doi produși există o mare asemănare. În toate cazurile, moleculele dublu-elicoidale prezintă o tranziție bruscă helix-ghem în momentul desfacerii celor două catene interacționate. Curba de tranziție termică a complexului poli-A + poli-U ne arată că cele două catene au fost constituite sub forma dublu-elicoidală, stabilă pînă la temperatura de 50°C. După această temperatură, și anume în jurul punctului de la 60°, cele două catene încep să se separe, astfel că la aproximativ 70°C, cînd valoarea absorbanței a înregistrat cifra maximă, lanțurile de poli-A și poli-U se găsesc independente în soluție, încolăcite la întîmplare sub formă de ghem.

Variația rotației optice specifice a acizilor ribonucleici. Cercetările lui Tamm și colab. (1952) au dovedit că activitatea optică specifică a ADN nativi este mult mai mare decît a componentelor lor mononucleotidice. Ulterior s-a observat că, în funcție de temperatură, rotația optică a ARN (ca și a ADN) variază concomitent cu absorbanța (fig. 25). Cu această ocazie s-a remarcat că scăderea rotației optice a soluțiilor de acizi nucleici are loc o dată cu ridicarea temperaturii și se datorește distrugerii structurii organizate a moleculelor lor. Rotația optică crescută a polinucleotidelor nedenaturate, în comparație cu cele denaturate sau cu componentele lor mononucleotidice, se datorește conținutului în regiuni dublu-elicoidale existente în macromoleculă. Întrucît rotația specifică este puțin influențată de legăturile de hidrogen, urmărirea valorii sale în funcție de temperatură oferă informații în special asupra conformației elicoidale a macromoleculei. Faptul că profilul tranziției termice (care depinde de legăturile de hidrogen inter- și intramoleculare) este identic cu profilul scăderii rotației optice, în funcție de temperatură, demonstrează, pe de o parte, că molecula de ARN prezintă o anumită structură organizată elicoidală, iar pe de altă parte că, în structura organizată, legăturile de hidrogen au avut un rol hotărîtor.

O bună corespondență între schimbarea rotației specifice și a densității optice a fost pusă în evidență în complexul dublu elicoidal de poli-A + poli-U în timpul denaturării termice (fig. 26). Prin aceasta s-a demonstrat corelația directă dintre ruperea legăturilor de hidrogen a celor două catene interacționate, cu tranziția lor din stare helix în stare încolăcită la întîmplare (Doty și colab., 1959).

Activitatea RN-azei pancreatice. În mod surprinzător, activitatea RN-azei pancreatice crește cu ridicarea temperaturii soluțiilor de ARN (Kunitz, 1940 ; Doty și colab., 1959). Enzima este suficient de activă asupra ARN monocatenar și la temperatura camerei, dar activitatea ei optimă se manifestă în special la 65°C (Kunitz, 1940). Cauza acestei comportări curioase s-a găsit a fi în însăși structura macromoleculelor de ARN. RN-aza

își manifestă acțiunea ei specifică de hidroliză a ARN proporțional cu gradul de dezordonare al moleculelor acestui compus. Foarte recent, Nonoyama și Ikeda (1964), bazîndu-se pe această proprietate, stabilesc profilul temperaturii de tranziție a unui ARN pe care, după comportarea față de RN-ază, îl consideră bicatenar.

Urmărind variația activității RN-azei în funcție de temperatură asupra ARN, s-a observat că pînă la 95°C produsul studiat de ei nu este hidrolizat. În schimb, în intervalul de temperatură cuprins între 95° și 105°C s-a remarcat o creștere bruscă a cantității produșilor de hidroliză, ceea ce a demonstrat că, în această zonă de temperatură, activitatea RN-azei a fost maximă.

Aceasta înseamnă că atît timp cît bazele azotate ale acestui ARN au fost angajate în legături de hidrogen, ribonucleaza nu a putut hidroliza legăturile *3′—5′* internucleotidice. Prin încălzirea peste 95°C, punțile de hidrogen dintre baze s-au rupt, iar enzima a avut posibilitatea de a-și manifesta acțiunea de hidroliză specifică.

Aspectul profilului curbei de tranziție termică a acestui ARN se aseamănă cu acela al complexului bicatenar de tipul poli-A + poli-U, cît și cu acela al ADN bicatenar. În toate aceste cazuri s-a remarcat o creștere bruscă a absorbanței (dacă s-a urmărit valoarea densității optice) sau a can-

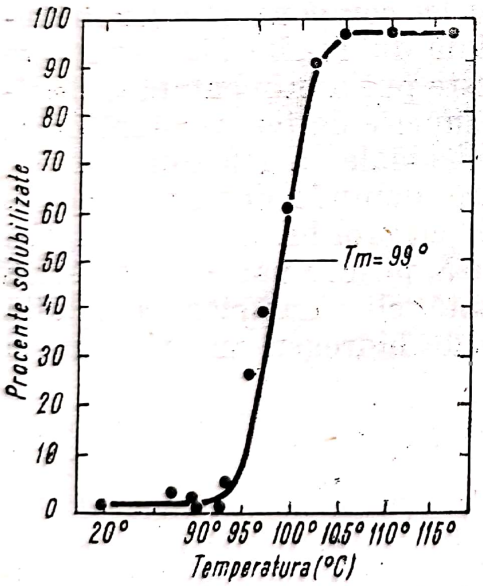


Fig. 28. — Tranziția termică a unui ARN bicatenar rezistent la acțiunea ribonucleazei. Probele de ARN încălzite la temperaturile indicate au fost răcite brusc la 0° și supuse acțiunii RN-azei (10 μg, 20 min la 37°), după care s-a determinat fracțiunea acidoinsolubilă (după Nonoyama și Ikeda, 1964).

tității de ARN hidrolizat (dacă s-a cercetat activitatea RN-azei) în jurul temperaturii de topire mijlocie (Tm)*. Pe baza acestei analogii s-a considerat că produsul analizat a fost bicatenar.

ARN studiat de Nonoyama și Ikeda (1964) a avut Tm situat la 99°C. Se pare că toți ARN bicatenari au caracteristica comună de a avea valoarea

* Tm reprezintă temperatura la care creșterea absorbanței la 260 mμ atinge 50% din valoarea totală.

Tm în jurul temperaturii de 100°C. Astfel, ARN bicatenar descris de Weismann și Borst (1963) a avut Tm=104°C, iar cel extras din celulele infectate cu virusul encefalomiocarditei a prezentat Tm = 96°C (fig. 28).

Prezența ARN bicatenar s-a semnalat în unele virusuri (Reovirusuri) și celule infectate cu virusuri ce conțin ARN.

Reacția ARN cu ureea și formaldehida. Ureea, formaldehida și alte substanțe care acționează specific asupra legăturilor de hidrogen modifică structura și proprietățile ARN. Dacă se tratează soluția de ARN infectant extras din VMT cu uree 6 M, se observă creșterea cu 13% a densității optice (determinată la 260 mμ) și dispariția infectivității produsului. Înlăturarea ureei prin dializă face ca atît densitatea optică, cît și infectivitatea soluției să revină la valorile lor inițiale.

Ureea 6 M modifică în același timp și curba de tranziție termică a ARN extras din VMT, deplasînd-o cu aproximativ 25°C spre temperaturile scăzute (Spirin și colab., 1959, Gavrilova și colab., 1959). Modificările observate au fost atribuite schimbărilor induse de uree în structura secundară a acestui ARN. Aceleași cercetări au scos în evidență un fapt deosebit de important, anume că tranzițiile macromoleculei sînt reversibile în condițiile experimentale în care structura sa primară nu este afectată. Schimbările intervenite în legăturile de hidrogen intramoleculare au un efect redus asupra infectivității.

Într-o serie de lucrări, Portocală și Samuel (1963), Portocală și colab. (1964 *a*, *b*) au arătat că ARN extras din creierul de șoarece inoculat cu virusul encefalomiocar-

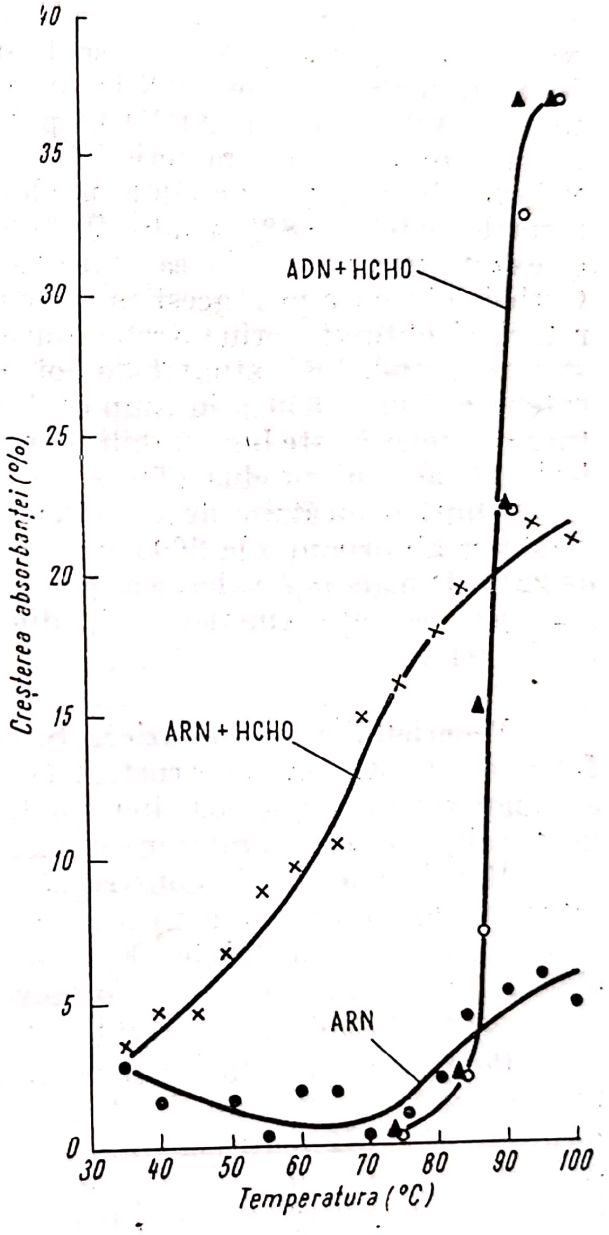


Fig. 29. — Variația absorbanței în funcție de temperatură a soluțiilor de ARN din ficatul de șoarece în absența (●) și prezența (×) formaldehidei 0,48%. A treia curbă a fost obținută cu ADN din timusul de vițel încălzit în prezența formaldehidei 0,48% (după Popa și Portocală, 1966).

ditei murine (MM) şi supus acţiunii căldurii suferă unele modificări reversibile ale proprietăţilor biologice şi fizico-chimice.

Reversibilitatea modificărilor suferite în cursul încălzirii a putut fi demonstrată şi cu un ARN extras din ficatul de şoarece. Acest produs încălzit la 80° timp de 10 min şi apoi răcit nu-şi schimbă semnificativ valoarea absorbţiei la 260 mμ. Încălzit la 100° timp de 10 min şi apoi răcit la temperatura camerei, el îşi măreşte absorbanţa numai cu aproximativ 5% (fig. 29). Aceasta se datoreşte modificărilor reversibile pe care le suferă moleculele de ARN în timpul răcirii. În schimb, denaturarea termică a ARN (ca şi a ADN) în prezenţa formaldehidei este ireversibilă. Această proprietate caracteristică ne-a permis să demonstrăm că urmărirea valorii absorbanţei acizilor nucleici în timpul încălzirii în prezenţa formaldehidei 0,48% poate fi întrebuinţată ca o metodă sensibilă şi exactă pentru stabilirea tranziţiei termice (Popa şi Portocală, 1965). Curbele obţinute prin acest procedeu sînt similare cu cele descrise în literatură şi obţinute prin întrebuinţarea unui echipament special de termostatare. Astfel, ARN studiat de noi se comportă ca polinucleotidele monocatenare (Tm = 65°C), în timp ce ADN din timusul de viţel a cărui structură bicatenară este bine stabilită prezintă curba de tranziţie termică caracteristică acestui produs (Tm = 88°C).

După o încălzire de 10 minute la 100°C în prezenţa formaldehidei, creşterea absorbanţei la 260 mμ a ARN extras din ficatul de şoarece a fost de 22%. Din această valoare se poate deduce, conform calculului menţionat mai jos, că aproximativ 55% din molecula de ARN este angajată în dublu helix.

Proprietăţile acido-bazice. Studiile detaliate efectuate de Cox şi Littauer (1963), Cox şi Arnstein (1963) asupra proprietăţilor acido-bazice ale unor acizi ribonucleici ribozomali au arătat că structura lor secundară nu rezultă dintr-un aranjament fortuit al bazelor azotate.

Rezultatele lor demonstrează că în soluţie acidă rezidiile adeninei interacţionează pentru a forma zone ordonate stabile. În soluţii neutre aceste zone sînt instabile. Este interesant de menţionat că polimerul sintetic poli-AGUC care are o secvenţă neregulată a bazelor nu pare să formeze zone moleculare stabile în soluţii acide.

Pe de altă parte modificările proprietăţilor acido-bazice în funcţie de temperatură ale ARN din *E. coli* alături de datele titrării spectrofotometrice au arătat că la pH neutru cele mai multe rezidii de citozină se găsesc în zonele ordonate ale moleculei. Acestea sînt rezistente atît la acizi sau baze, cît şi faţă de temperatură. Stabilitatea lor este apropiată de aceea a ADN nativ.

Toate aceste constatări conduc la concluzia că secvenţa nucleotidelor ARN ribozomal nu este neregulată. Totodată ele confirmă măsurătorile viscozimetrice anterioare efectuate asupra ARN ribozomal din *E. coli* supus acţiunii unor soluţii cu forţă ionică scăzută (Cox şi Littauer 1962), care au dovedit că domeniile ordonate ale moleculei sînt bogate în citozină.

Scanned with OKEN Scanner

Conținutul în duble elice al moleculelor de ARN. ADN din timusul de vițel este un produs natural, care conține toate bazele azotate ale celor două lanțuri complimentare, angajate în legături de hidrogen. Din această cauză, el este considerat ca un polinucleotid model cu o configurație dublu-elicoidală perfectă (stare helix de 100%). Dacă acest acid nucleic este încălzit astfel ca cele două lanțuri să se desfacă, realizîndu-se denaturarea lui completă (stare ghem de 100%), se observă creșterea densității optice cu aproximativ 40% (Doty și colab., 1959; Mahler și Pereira, 1962; Sarkar, 1962).

Pe de altă parte, denaturarea totală a unor ARN de diferite origini a dus la creșterea densității lor optice cu 20—25% (Sarkar, 1962; Spirin, 1963; Popa și Portocală, 1965). Din valoarea acestei creșteri se poate deduce, printr-un calcul simplu, considerînd 100% creșterea de 40% observată la denaturarea ADN, că moleculele de ARN conțin în general 50—60% regiuni ordonate sub formă de elice dublă. Restul de 40—50% reprezintă porțiuni din lanț neinteracționate, încolăcite neorganizat.

Rezultate similare se obțin și din compararea valorilor rotației specifice a unui ARN natural oarecare cu a unui polinucleotid dublu-elicoidal perfect. De exemplu, complexul polinucleotidic poli-A + poli-U, care are o conformație dublu-elicoidală de 100%, prezintă valoarea rotației optice specifice $(\alpha)_{D^{20}}$ de + 300. În aceleași condiții experimentale, ARN are valoarea $(\alpha)_{D^{20}}$ de aproximativ + 170° (Doty și colab., 1959). Din raportarea acestor valori rezultă și în acest caz că aproximativ 60% din molecula de ARN este ordonată.

Haselkorn și Doty (1961) au descris o metodă spectrofotometrică pentru determinarea fracțiunii moleculei de ARN angajată în legături de hidrogen. Metoda se bazează pe creșterea absorbției spectrale a polinucleotidelor monocatenare în urma reacției cu concentrații mici de formaldehidă.

Condițiile de reacție pentru determinarea conținutului în zone elicoidale ale ARN sînt: temperatura de 23°—24°C, tăria ionică de 0,25, pH-ul = 6,8 și concentrația de HCHO egală cu 0,3 g%.

Este important de menționat faptul că urmărirea denaturării se face prin citirea valorii absorbției ARN la 245 mμ după diferite perioade de timp. În condițiile în care creșterea absorbției la această lungime de undă rămîne sub 5%, înregistrarea valorilor spectrale de la 270, 275 și 285 mμ permite să se calculeze porțiunea moleculei de ARN care conține grupe aminice libere.

În cazul ARN-VMT, această fracțiune este de 40% la 25°C, forță ionică de 0,25, tampon fosfat cu pH 6,8. Cercetările noastre efectuate asupra ARN din creierul (Popa și colab., 1966 *b*) și ficatul (Popa și colab., 1966 *e*) de șoarece ne-au arătat că în cazul acestor acizi nucleici fracțiunea moleculelor neangajate în legături de hidrogen este de aproximativ 60%; această valoare este mai mare decît cea care rezultă din valoarea creșterii absorbanței în funcție de temperatură (circa 45%). Comparativ cu ARN

Scanned with OKEN Scanner

din VMT, ARN ribozomali din cele două ţesuturi animale studiate au un grad de dezvoltare mai mare.

Natura legăturilor din interiorul regiunilor ordonate elicoidal. Una dintre cele mai demonstrative experienţe care dovedeşte existenţa legăturilor de hidrogen dintre lanţurile poliribonucleotidice poate fi considerată aceea realizată de Szer şi Shugar în 1961. Aceşti autori arată că acidul polimetil-uracilic (poli-mU), spre deosebire de acidul poliuridilic (poli-U), nu prezintă o structură secundară şi nici nu formează complexe cu acidul poliadenilic (poli-A).

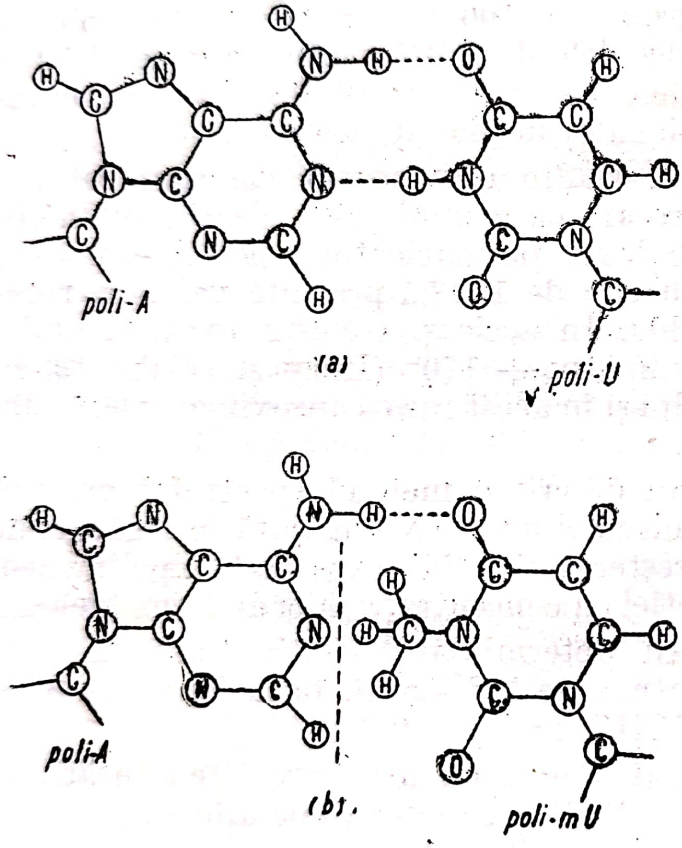


Fig. 30. — Legăturile de hidrogen în cazul complexului poli-A + poli-U (*a*) şi modul prin care este împiedicată formarea unei legături de hidrogen de gruparea metil, în cazul complexului poli-A + poli-mU (*b*).

Explicaţia acestei comportări este atribuită faptului că, în timp ce poli-U poate forma două legături de hidrogen, poli-mU nu poate forma decît o singură legătură de hidrogen cu poli-A (fig. 30), ceea ce este insuficient pentru a conferi stabilitate complexului. Prin urmare, introducerea unui substituent de tipul metilului la azotul din poziţia 3 a ciclului pirimidinic creează un obstacol în realizarea celei de-a doua legături de hidrogen. Împiedicarea sterică a formării celei de-a doua legături de hidrogen datorită metilului pare a fi cea mai adecvată interpretare dată fenomenului observat. Formarea legăturilor de hidrogen între bazele complimentare a fost pusă în evidenţă direct cu ajutorul metodei difracţiei razelor X.

Scanned with OKEN Scanner

Atît polinucleotidele naturale, cît și cele sintetice care au o structură fibrilară oferă mai puține date în experiențele de difracție a razelor X decît cristalele simple. Totodată, secvența neregulată a bazelor din produșii naturali duce la o difracție a razelor X necoerentă, astfel încît struc-

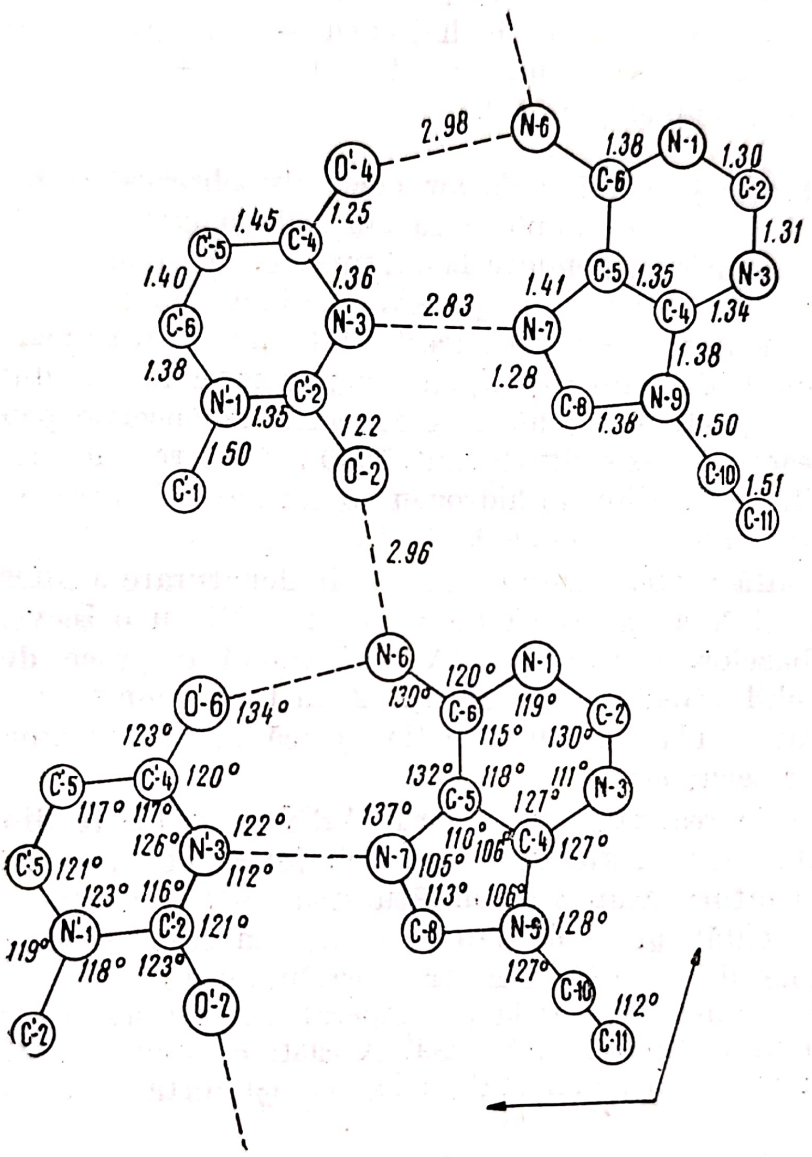


Fig. 31. — Distanțele legăturilor și unghiurile complexului N-etil-adenină și N-metil-uracil. Figura reprezintă porțiuni din două unități celulare împreună cu legătura de hidrogen care unește cele două perechi de baze. Eroarea determinărilor este apreciată la $\pm 0{,}008$ Å în cazul lungimii legăturilor și de $\pm 0{,}6°$ în cazul unghiurilor (după Mathews și Rich, 1964).

tura lor nu poate fi determinată prin această metodă. S-a observat însă că studiul complecșilor intermoleculari formați între derivații bazelor

purinice şi pirimidinice pot oferi informaţii asupra structurii polinucleotidelor. De exemplu, complexul format în stare cristalină între N^9-etiladenina şi N^1-metil-uracilul a putut fi analizat prin metoda difracţiei tridimensionale a razelor X, folosindu-se 2 700 de reflexiuni. Această analiză a dovedit că derivaţii adeninei şi ai uracilului se împerechează prin intermediul a două legături de hidrogen — una între grupa aminică a adeninei cu O—4 al uracilului, iar a doua între N—3 al uracilului cu N—7 imidazolic al adeninei (fig. 31).

Stabilitatea şi energia dublelor elice. S-a observat că poliribonucleotidele homopolimere se comportă ca lanţurile macromoleculelor simple şi se găsesc în soluţie înghemuite la întîmplare. Dacă însă, la soluţia unui astfel de polimer, de exemplu poli-A, se adaugă un homopolimer al unei baze complementare, un poli-U, aceştia interacţionează imediat, rezultînd molecule hibride de poli-(A + U) cu o conformaţie de elice dublă. Reacţia este atît de rapidă, încît sînt necesare metode speciale pentru studiul vitezei de reacţie (Ross şi Sturtevant, 1960). Formarea moleculelor hibride este atribuită legăturilor de hidrogen ce iau naştere între bazele azotate complementare ale celor două lanţuri.

Pe de altă parte, studiul reacţiei de denaturare a diferitelor tipuri de ARN şi ADN a arătat că numai complecşii cu o secvenţă complementară a bazelor, de tipul poli-(A + U) suferă un proces de denaturare total reversibil (Geiduschek, 1962). Aceasta demonstrează că natura bazelor azotate din lanţul polinucleotidic joacă un rol hotărîtor în formarea structurii lor secundare.

Cercetările realizate cu ajutorul ARN naturali de diferite origini au confirmat acest punct de vedere. Astfel, Cox şi Littauer (1960), studiind efectul temperaturii asupra stabilităţii structurii secundare a doi ARN naturali cu greutăţi moleculare diferite, au remarcat că acidul nucleic cu greutatea moleculară înaltă suferă trecerea din forma helix în forma înghemuită (tranziţie helix-ghem) la o temperatură mai scăzută decît acidul nucleic cu greutatea moleculară joasă. Această comportare arată că elicele acestuia din urmă sînt mai stabile la aceeaşi forţă ionică decît elicele primului.

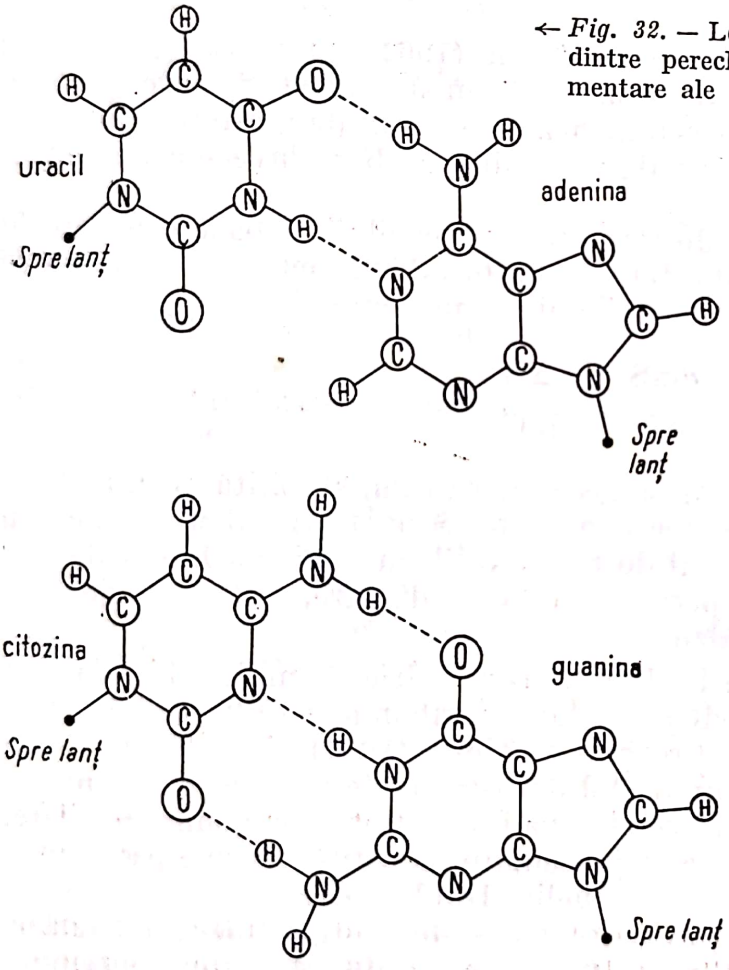
Dacă stabilitatea elicelor se datoreşte numărului de perechi de baze complementare existente pe fiecare regiune elicoidală şi abundenţei perechilor guanină-citozină (G—C), ARN cu greutate moleculară joasă ar trebui să fie favorizat din acest punct de vedere. Dozarea conţinutului în baze azotate a confirmat această presupunere. Astfel, ARN cu greutate moleculară joasă este constituit din 32,1 moli % guanină şi 28,9 moli % citozină, în timp ce ARN înalt polimerizat conţine numai 28,9 moli % guanină şi 22,0 moli % citozină.

Scanned with OKEN Scanner

Stabilitatea mai mare față de tratamentul termic a ARN cu un conținut mai bogat în guanină și citozină este atribuită numărului lor mai mare în legături de hidrogen. Într-adevăr, după cum se știe, guanina și citozina se leagă prin trei punți de hidrogen, în timp ce adenina și uracilul numai prin două (fig. 32).

Spirin (1961, 1962), analizînd mai mulți ARN înalt polimerizați, constată existența unei corelații liniare între stabilitatea termică și conținutul lor în G + C (fig. 33).

Pullman și Pullman (1959), bazați pe calculul orbitalilor moleculari, au ajuns la concluzia că perechea de baze G—C constituie un sistem donator



← *Fig. 32.* — Legăturile de hidrogen dintre perechile de baze complementare ale acizilor ribonucleici.

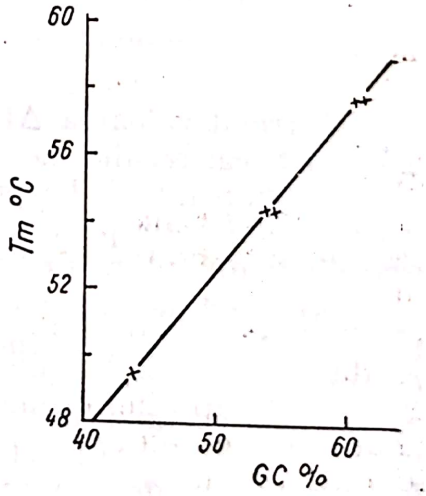


Fig. 33. — Dependența temperaturii de topire medie (Tm) de compoziția în baze azotate a unor acizi ribonucleici (după Spirin, 1962).

și acceptor de electroni mai bun decît perechea A—T. În consecință, legăturile dintre primele sînt mai puternice decît cele dintre ultimele, fapt care duce la creșterea stabilității dublelor elice ale polinucleotidelor bogate în G—C.

Prin urmare, se admite că stabilitatea dublelor elice ale macromoleculelor de ARN se datoreşte perechilor de baze guanină-citozină şi adenină-uracil. Existenţa altor perechi de baze pare a fi improbabilă datorită atît unor cauze de ordin steric, cît şi a distanţei prea mari dintre ele, ceea ce împiedică formarea legăturilor de hidrogen necesare (Fresco şi colab. 1960).

Măsurarea prin metode calorimetrice a tranziţiei ghem-helix a unor polinucleotide sintetice şi naturale (ADN) a permis să se stabilească că energia legăturii unei perechi de baze este de aproximativ 7 Kcal (Sturtevant şi colab., 1958; Rawitscher şi colab., 1963).

Urmărirea variaţiei energiei libere în cursul tranziţiei termice a acizilor nucleici este o altă metodă prin care s-a ajuns la calcularea energiei legăturilor dintre baze.

După cum arată Crothers şi Zimm (1964), tranziţia ghem-helix este parţial determinată de o variabilă termodinamică S, care poate fi considerată ca o constantă de echilibru a procesului de creştere a lungimii unei secvenţe de baze pe cheltuiala perechilor de baze învecinate neîmperechiate.

Dacă ΔH este căldura de formare a perechilor de baze din perechi neîmperechiate, variaţia constantei de echilibru S în funcţie de temperatură poate fi redată prin relaţia termodinamică cunoscută :

$$\frac{d\ln S}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2}$$

Întrucît valoarea ΔH este cunoscută, ea fiind stabilită prin metoda calorimetrică, rezultă că valoarea constantei S poate fi calculată pentru diferite temperaturi. La punctul de topire mijlociu, energia liberă de formare a unui helix pentru o pereche de baze dispare, astfel că TS este egal cu temperatura de încălzire.

Aplicînd această teorie la determinarea tăriei complexului format între polidezoxicitidilat (poli-dC) şi polidezoxiribonucleotidul hipoxantinei (acidul inozinic sau poli-dI), Crothers şi Zimm (1964) ajung la concluzia că valoarea energiei libere a unui mol de perechi de baze este de aproximativ 8 Kcal. După aceşti autori, energia liberă a bazelor neîmperechiate, fiind mai mare decît a bazelor împerechiate, constituie principala sursă care condiţionează tranziţia ghem → helix. Dublele elice ale polinucleotidelor sînt stabilizate în cea mai mare parte de energia liberă a bazelor, în timp ce legăturile de hidrogen dintre perechile de baze contribuie numai într-o mică măsură.

Este important de arătat că în cursul ultimilor ani s-au acumulat şi alte date teoretice şi experimentale care ajung la concluzii asemănătoare. Astfel, calculele lui De Voe şi Tinoco (1962) au demonstrat că, după toate probabilităţile, energia legăturilor de hidrogen nu contribuie prea mult la stabilitatea dublelor elice. Rolul legăturilor de hidrogen pare să fie

Scanned with OKEN Scanner

acela de a asigura împerecherea bazelor în interiorul dublelor elice. Stabilitatea helixului (energia liberă negativă a helixului) este proporțională cu conținutul său în perechi guanină-citozină. Variația entalpiei în timpul formării helixului s-a găsit a fi $\Delta H = H$ helix $- H$ ghem $= -8$ Kcal/mol perechi de baze.

Tratarea separării lanțurilor polinucleotidice angajate în dublu helix (denaturarea), din punctul de vedere al mecanicii statistice, dovedește că stabilitatea helixului ADN este menținută de alte forțe decît cele ale legăturilor de hidrogen (Gibbs și Di Marzio, 1959).

Pe de altă parte s-a observat că o serie de substanțe considerate inactive față de legăturile de hidrogen pot provoca desfacerea dublelor elice ale polinucleotidelor (Helmkamp și Ts'o, 1961; Geiduschek și Herskovits, 1961). Totodată s-a remarcat că anionii $Cl_3C\,COO^-$, $F_3C\,COO^-$, CNS^- și ClO_4^- micșorează Tm al moleculei de ADN la pH neutru cu mai mult de 60° (Hamaguchi și Geiduschek, 1962). Unii agenți specifici pentru denaturarea proteinelor s-au dovedit a avea un efect relativ redus asupra denaturării moleculei de ADN.

Din datele prezentate mai sus se poate ajunge la concluzia că la energia de stabilizare a dublelor elice legăturile de hidrogen par să aibă o contribuție de minimă importanță. Rolul major este atribuit mai curînd variației energiei libere a perechilor de baze. În ceea ce privește legăturile de hidrogen, concluzia este similară cu aceea împărtășită recent de unii cercetători care arată că aceste legături contribuie într-o mică măsură la stabilizarea moleculelor de proteine (Kauzmann, 1959; Klotz și Frazen, 1962).

Așezarea perechilor de baze și numărul lor minim într-un helix. Interpretarea rezultatelor difracției razelor X, a temperaturii de tranziție și comportarea față de unii agenți chimici a ARN a condus la concluzia unanim recunoscută azi că elicele sale duble sînt diferite de acelea ale ADN, fiind relativ scurte și imperfecte.

Întrucît molecula de ARN este constituită în majoritatea cazurilor dintr-un singur lanț polinucleotidic, iar regiunile sale elicoidale rezultă din interacțiunea bazelor complimentare ale aceluiași lanț, se pune întrebarea care este modul de așezare al bazelor în interiorul dublelor elice.

Fresco și colab. (1960) au examinat posibilitatea formării numărului maxim de perechi de baze intramoleculare în cazul unui lanț polinucleotidic cu secvență întîmplătoare a bazelor. Ei au observat că acest tip de lanț, format, de exemplu, din 22 de baze, poate constitui numai trei perechi de baze complimentare. Dacă însă se admite existența unor „bucle" de-a lungul lanțului polinucleotidic, numărul perechilor crește la șapte (fig. 34).

Modelele experimentale realizate cu ajutorul unor polinucleotide sintetice au permis să se verifice existența „buclelor" și totodată să precizeze mecanismul după care se împerechează bazele în dublele elice.

Scanned with OKEN Scanner

Astfel, urmărindu-se stabilitatea complexului format între copolimerul poli-AU şi homopolimerul poli-U, s-a remarcat că ea a fost maximă atunci cînd numărul monomerilor de uracil din poli-U a fost egal cu numărul monomerilor de adenină din poli-AU. Aceasta dovedeşte, pe de

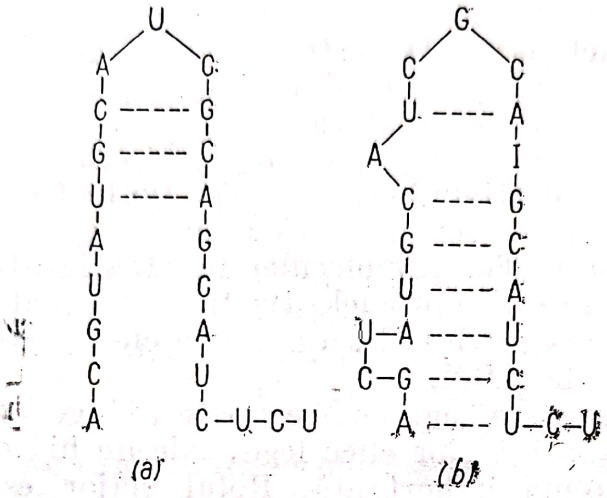


Fig. 34. — Un lanţ polinucleotidic constituit din 22 de baze cu o secvenţă întîmplătoare poate forma numai trei perechi de baze (*a*), în timp ce dacă în acelaşi lanţ apar „bucle" pot exista şapte perechi de baze (*b*).

o parte, că numai bazele complimentare din cele două lanţuri contribuie la stabilizarea complexului lor, iar pe de altă parte că baze din poli-AU care nu-şi „găsesc" perechea rămîn libere. Totodată, s-a remarcat instabilitatea complexului la 25°C atunci cînd bazele neangajate depăşesc o treime din numărul total de baze. Mai mult decît atît, s-a putut pune în evidenţă prezenţa bazelor neîmperechiate din poli-AU în „buclele" lanţului său (Fresco şi colab., 1960). Cu ajutorul acestor experienţe s-a demonstrat natura imperfecţiunilor din dublele elice. Pe de altă parte, există o corelaţie directă între lungimea şi stabilitatea elicelor. O structură elicoidală (chiar imperfectă) va fi cu atît mai stabilă cu cît lungimea ei va fi mai mare. Din această cauză se pot obţine informaţii importante asupra numărului minim de perechi de baze dintr-un helix, studiindu-se stabilitatea termică a complecşilor formaţi între lanţuri complimentare de diferite lungimi. În urma acestor experienţe s-a dovedit că o regiune elicoidală poate fi stabilizată de 4 pînă la 6 perechi de baze. Aceste perechi ar defini deci regiunile elicoidale cu stabilitate minimă. În cazul unui ARN înalt polimerizat, a cărui tranziţie helix-ghem are loc într-o zonă largă de temperatură (20°—90°), este de aşteptat ca numărul perechilor de baze din zonele elicoidale să fie mai mare, iar proporţia buclelor să fie mică.

La aceste molecule, numărul perechilor de baze pe zonă ordonată în elice este apreciat la aproximativ 10.

Analizele spectrelor de difracție a razelor X. Mult timp cercetările efectuate cu ajutorul metodei razelor X pentru a stabili conformația moleculelor de ARN nu au dat rezultate satisfăcătoare, imaginile obținute fiind difuze și din această cauză greu interpretabile. Recent, Spencer și colab. (1962), cercetînd structura ARN-*S* cu ajutorul razelor X, au obținut imagini satisfăcătoare, care au putut fi interpretate. După acești autori, diagrama stării fibrilare pusă în evidență la ARN-*S* se aseamănă

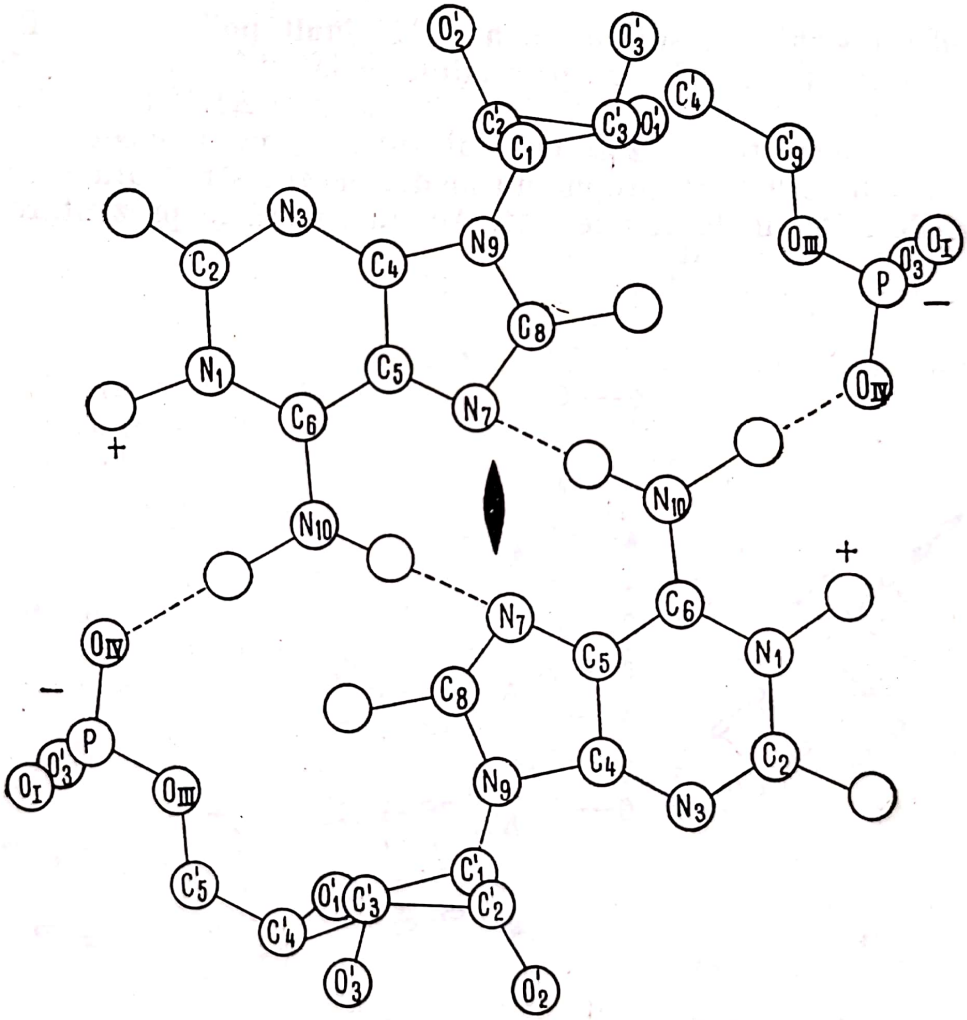


Fig. 35. — Structura bicatenară a acidului poliadenilic. Liniile întrerupte reprezintă legăturile de hidrogen, iar semnul din centru axa de simetrie (după Rich și colab., 1961).

foarte mult cu diagrama configurației „A" a ADN. Din aceste rezultate s-a dedus că ARN-*S* prezintă secvența nucleotidelor complimentară în interiorul helixului, astfel încît spirele lui sînt antiparalele.

Pe de altă parte, cercetările efectuate asupra ribopolinucleotizilor sintetici au dus la rezultate similare. Între două sau chiar trei lanţuri polinucleitidice pot lua naştere elice duble sau triple. Astfel, acidul poliinozinic împreună cu acidul policitidilic formează, prin intermediul legăturilor de hidrogen molecule hibride, care au conformaţie dublu-elicoidală. Aceeaşi configuraţie a fost găsită de Rich şi colab. (1961) şi la acidul poliadenilic (fig. 35). Este important de menţionat că dublele elice rezultate prin interacţiunea lanţurilor poliribonucleotidice sintetice au proprietăţi fizice şi structurale similare cu a produşilor naturali (Rich şi Davies, 1956).

Modelul structurii secundare a ARN înalt polimerizat. Bazaţi pe rezultatele difracţiei razelor X, pe studiul variaţiei în funcţie de temperatură a densităţii optice şi a rotaţiei specifice a unor ARN naturali, precum şi pe unele experienţe realizate cu ajutorul unor polinucleotide sintetice, Fresco şi colab. (1960) au propus un model pentru structura secundară a moleculei de ARN înalt polimerizat. Acesta constă în prezentarea meca-

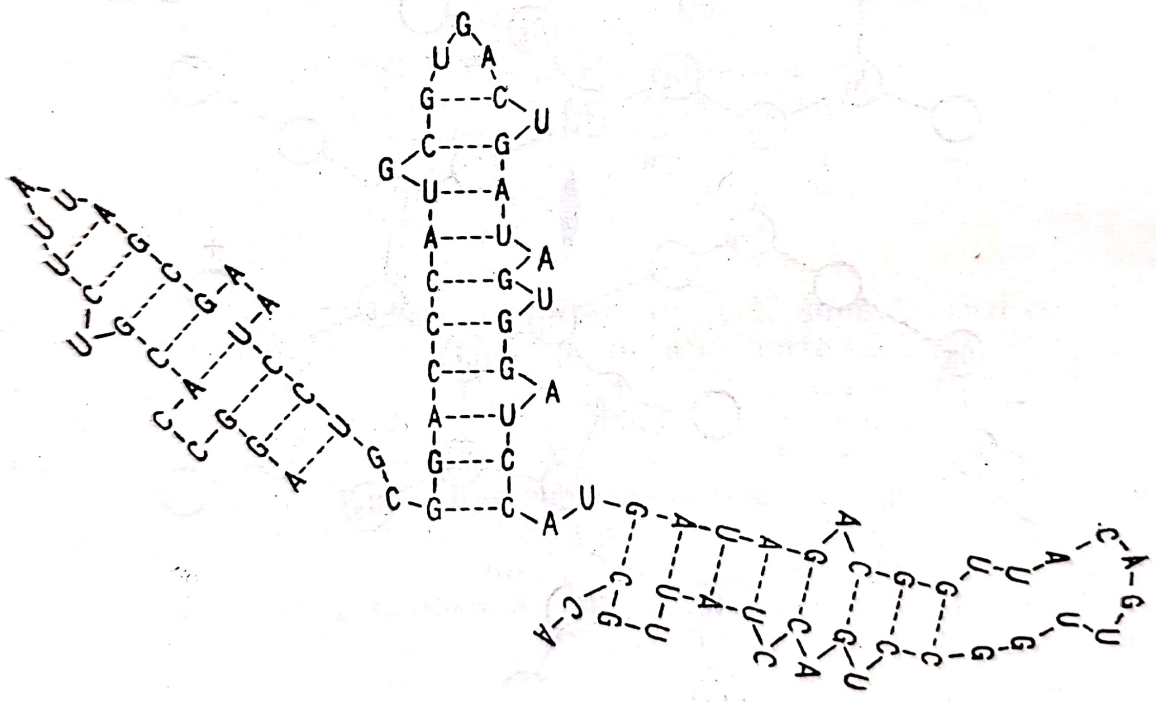


Fig. 36. — Modelul structurii secundare a acizilor ribonucleici înalt polimerizaţi (după Fresco şi colab., 1960).

nismului probabil prin care bazele azotate, distribuite fără o ordine anumită de-a lungul aceluiaşi lanţ polinucleotidic, interacţionează pentru a da naştere unor regiuni scurte de molecule ordonate elicoidal, alternînd cu regiuni ale aceluiaşi lanţ, încolăcite la „întîmplare" (*random-coil*).

Scanned with OKEN Scanner

În ceea ce privește regiunile ordonate, se consideră că ele sînt imperfecte, prezentînd unele neregularități, numite „bucle". Acestea din urmă permit, în cazul unei secvențe oarecare a bazelor în moleculă, interacțiunea lor maximă în interiorul aceluiași lanț (fig. 36).

Modelul propus este în bună concordanță cu majoritatea observațiilor experimentale prezentate în cursul acestui capitol. De exemplu, el ne explică de ce curba de tranziție termică a ARN urmărește un profil de creștere relativ lentă datorită „topirii" succesive a regiunilor ordonate, spre deosebire de acela a ADN, care crește brusc în jurul temperaturii sale de topire, demonstrînd desfacerea dintr-odată a elicelor duble perfecte. Este foarte probabil însă că proporția perechilor de baze din zonele elicoidale ale ARN naturali înalt polimerizați să fie mai mare decît aceea pe care o sugerează modelul de mai sus. În același timp, s-ar putea să existe și mai puține imperfecțiuni în interiorul elicelor.

La aceste presupuneri conduc atît unele date experimentale (Fresco și colab., 1961), cît și calculul energiei libere a dublelor elice.

Modelul structurii secundare a ARN-*S*. Analiza structurii ARN-*S*, efectuată de Spencer și colab. (1962) cu ajutorul metodei difracției razelor X, a sugerat acestor cercetători ideea că lanțul polinucleotidic al ARN-*S* se găsește ordonat ca ADN, sub forma dublei elice perfecte, propusă de Watson și Crick (1953).

Din determinarea bazelor terminale ale diferiților ARN-*S* studiați s-a ajuns la concluzia că lanțul acestora prezintă la un capăt adenina ca bază terminală, urmată de două molecule de citozină (deci secvența A—C—C—), iar al doilea capăt se termină cu guanina (Zachau și colab., 1958; Hecht și colab., 1959). Comportarea ARN-*S* față de acțiunea unor enzime a condus la o altă observație privind structura lui. Astfel, Preiss și colab. (1961) au remarcat că, în cursul degradării enzimatice, ARN-*S* eliberează mai ușor A—C decît alte baze. De aici presupunerea că aceste două baze sînt mai accesibile acțiunii enzimatice, ele nefiind angajate în dublele elice. În această ordine de idei reamintim lucrarea recentă a lui Nonoyama și Ikeda (1964), care au demonstrat că molecula de ARN dublu spiralată este rezistentă la acțiunea RN-azei.

În ceea ce privește mărimea moleculei de ARN—*S*, s-a determinat că lungimea ei este de aproximativ 100 Å, grosimea de aproximativ 20 Å, iar greutatea moleculară de 24 000, ceea ce corespunde unui număr de aproximativ 67 de perechi de nucleotide.

Ținînd seama de rezultatele experimentale prezentate mai sus, precum și de unele considerente de ordin biologic legate de funcția ARN-*S*, în cursul sintezei proteice (de a se cupla cu acizii aminați, ca și rolul său în descifrarea codului înscris în secvența ARN—mesager), Zubay (1963) a formulat un model ingenios al structurii secundare a ARN-*S* (fig. 37). În acest model, un singur lanț polinucleotidic se îndoaie la jumătate pentru a interacționa cu sine însuși. Între cele două jumătăți ale lanțului iau

naştere în acest moment legături de hidrogen, iar conformaţia moleculei devine perfect dublu-elicoidală. Secvenţa bazelor în prima jumătate este antiparalelă cu secvenţa din cealaltă jumătate, iar fiecare helix conţine în medie aproximativ trei perechi de baze. În locul în care molecula se

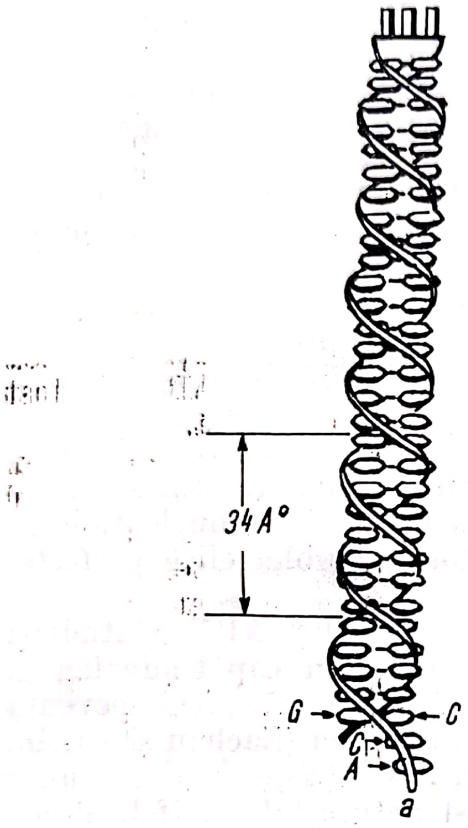


Fig. 37.—Modelul structurii secundare a ARN-*S* propus de Zubay (1963).

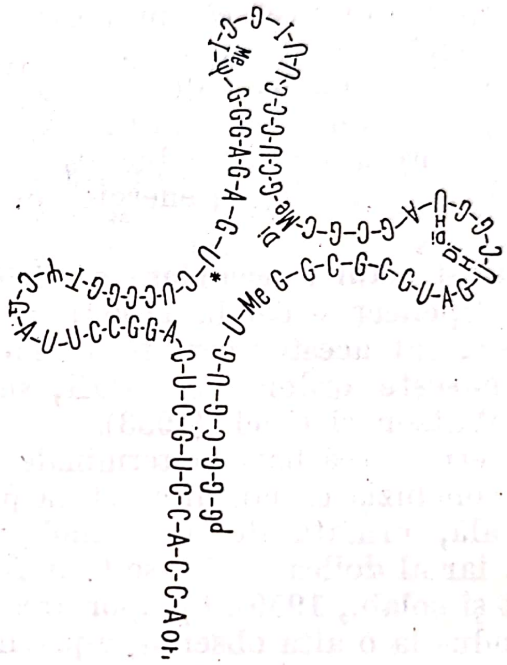


Fig. 38. — Unul din cele trei modele de structură secundară a ARN-*S* specific transferului de alanină (propus de Holley şi colab., 1965).

îndoaie rămîn trei baze neîmperechiate al căror rol biologic este fundamental. Ele sînt acelea care descifrează tripleta complimentară din lanţul ARN-*m*, de care se leagă apoi prin intermediul legăturilor de hidrogen. Prin urmare, secvenţa celor trei baze neîmperecheate ar trebui să fie specifică pentru mesajul unui anumit acid aminat.

Referitor la cele două capete ale moleculei, modelul presupune că unul dintre ele are două baze libere (A şi C), iar a treia bază a aceluiaşi capăt se cuplează cu baza terminală (G) a celuilalt capăt. Transferul acidului aminat este asigurat de adenina liberă din capătul moleculei.

Într-o lucrare recentă, Holley şi colab. (1965) prezintă secvenţa completă a nucleotidelor moleculei de ARN-S, specific transferului de alanină. Autorii propun trei structuri secundare posibile pentru acest produs. Figura 38 arată una din aceste posibilităţi. Nu ar exista nici

un motiv să se creadă că această formulare este mai bună decît celelalte două sau, eventual, să nu existe în realitate chiar o altă variantă. Modelul se bazează pe cunoștințele actuale privind posibilitățile de legare a bazelor azotate între ele.

Structura terțiară

Determinarea dicroismului absorbției în ultraviolet a fibrelor de acizi nucleici orientate s-a dovedit a fi metoda cea mai potrivită pentru obținerea unor informații asupra orientării moleculelor pirimidinice și purinice față de axul macromoleculelor. Ipoteza structurii terțiare, adică a unei anumite arhitecturi spațiale a macromoleculelor de ARN, a fost emisă în urma unor determinări realizate cu această tehnică.

Este cunoscut faptul că un sistem conjugat plănar, cum este ciclul pirimidinic, de exemplu, prezintă maximul de absorbție cînd vectorul electric al luminii, se găsește în planul ciclului său. În schimb, dacă vectorul electric este perpendicular pe planul ciclului, probabilitatea tranziției și, prin urmare, intensitatea absorbției este minimă (Beaven și colab., 1955; Spirin, 1963).

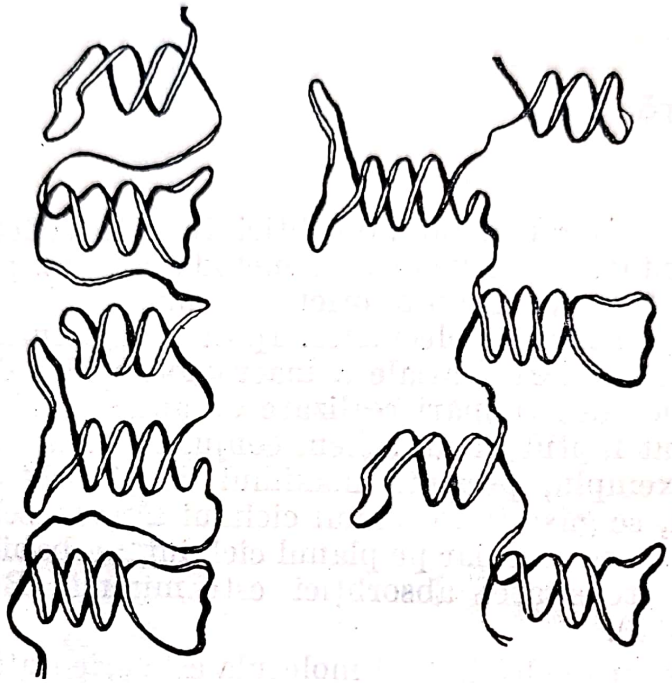
În cazul acizilor nucleici, dacă molecula este orientată într-o anumită direcție, se pot obține informații în legătură cu modul de așezare a planelor ciclurilor purinice și pirimidinice, față de planul axei macromoleculei. Se realizează aceasta prin urmărirea absorbanței luminii ultraviolete cu vectorul care coincide cu orientarea axei și, comparativ cu el, dirijat perpendicular pe ea. Într-adevăr, s-a remarcat că la ADN nativ, care are bazele orientate perpendicular pe axa moleculei, absorbanța este maximă (dicroism negativ) atunci cînd vectorul electric al luminii este în planul bazelor (Seeds, 1953; Beaven și colab., 1955).

Pe de altă parte, s-a dovedit că ARN înalt polimerizați au absorbanța maximă atunci cînd direcția vectorului electric al luminii coincide cu axul lung al macromoleculei (dicroism pozitiv) (Dvorkin și Spirin, 1960). Această proprietate a ARN a fost interpretată ca o dovadă experimentală că planurile bazelor se găsesc orientate paralel față de axul lung al macromoleculelor.

În cazul în care moleculele ar fi fost încolăcite la întîmplare și deci planurile bazelor nu ar fi avut o anumită orientare, nu s-ar fi observat nici un fel de diferență a valorii absorbanței lor prin orientarea vectorului electric al luminii, perpendicular sau paralel cu axa moleculei. Prin urmare, ARN în soluție nu se prezintă sub formă de ghemuri statistice, ci există posibilitatea ca el să prezinte o anumită orientare spațială, o anumită structură terțiară (Spirin, 1963).

Scanned with OKEN Scanner

Structura secundară a ARN înalt polimerizaţi defineşte aceşti compuşi ca polinucleotide monocatenare care posedă regiuni ordonate ale lanţului sub formă dublu-elicoidală alternate cu porţiuni de lanţ încolăcite la întîmplare. Ţinînd seama de această formulare, structura



I II

Fig. 39. — Cele două formulări propuse de Spirin (1960), pentru ilustrarea structurii terţiare a acizilor ribonucleici înalt polimerizaţi.

terţiară a ARN ar consta, după Spirin (1960), din aranjarea regiunilor ordonate elicoidal ale lanţului polinucleotidic, perpendicular pe axa lungă a moleculei. În acest fel, planurile bazelor se găsesc aşezate paralel faţă de direcţia axei macromoleculei, ceea ce corespunde cu dicroismul observat. Pentru explicarea aranjării zonelor elicoidale s-au propus două variante posibile (fig. 39). Aceste două formulări presupun :

a) Regiunile elicoidale rezultă numai prin interacţiunea secţiunilor adiacente ale lanţului monocatenar polinucleotidic. Este exclusă interacţiunea bazelor dintre secţiunile îndepărtate ale lanţului.

b) În soluţii cu forţă ionică scăzută şi la temperatura camerei, regiunile dublu-elicoidale sînt orientate de preferinţă perpendicular pe axa lungă a macromoleculei. Aceste regiuni alternează cu secţiuni neordonate ale lanţului. În acest caz, întreaga moleculă are o tendinţă evidentă de a îmbrăca forma de bastonaş.

c) În soluții cu forță ionică crescută, în care puterea de repulsie între elice scade, moleculele pot suferi înghemuiri suplimentare, ceea ce determină o dezorientare a elicelor față de axa moleculei. La forțe ionice crescute, înghemuirea moleculei nu se datorește încolăcirii lanțului polinucleotidic monocaternar, ci contractării bastonașului.

d) Principiul aranjării zonelor ordonate, conform structurii terțiare descrise, se aplică numai moleculelor de ARN înalt polimerizate.

Morfologia moleculară

Introducerea metodelor fizice și fizico-chimice în biologie a condus la elucidarea unor probleme fundamentale în cele mai diferite domenii ale ei. Cele mai spectaculoase și fructuoase rezultate au fost obținute, fără îndoială, în studiul proprietăților acizilor nucleici, ceea ce justifică din plin atenția deosebită acordată de cercetători acestui domeniu. Toate metodele folosite au fost îndreptate asupra problemelor esențiale legate de acești compuși, și anume: structura, biodinamica și biosinteza lor, rolul lor în ereditate, în sinteza proteinelor etc. Pare deci firească și dorința de a pune în evidență, cu ajutorul microscopului electronic, aspectul și structura intimă a acizilor nucleici, tradusă morfologic. Din păcate, lucrările în această direcție sînt, pînă în momentul de față, puțin numeroase.

Problema esențială care a preocupat pe cercetători a fost în primul rînd aceea a alegerii metodelor care să permită punerea în evidență a acizilor nucleici. În momentul de față există trei metode care permit aceasta:

1. Colorarea cu acid fosfotungstic (A.P.T.) sau cu alți „coloranți" specifici, a preparatelor ce conțin acizi nucleici purificați, sau a acestor compuși parțial extrași din virusuri.

2. Metalizarea preparatelor care conțin purificate de acizi nucleici.

3. Obținerea de secțiuni ultrasubțiri din substratul cercetat (celulă infectată, virus izolat etc.).

Tehnica de colorare cu acid fosfotungstic, cunoscută de mult, a fost esențial modificată și îmbunătățită de Brenner și Horne (1959).

Soluția de acid nucleic, sau suspensia de virus, se amestecă în părți egale cu o soluție de 1% sau 2% de A.P.T., adusă la pH 7,5 cu ajutorul unei soluții normale de NaOH, și se pulverizează pe grile acoperite cu membrane de cărbune. Lucrînd cu microscoape cu o putere de rezoluție sub 10 Å, se obțin cele mai fine detalii de structură interioară a virusului examinat, în interiorul căruia se poate observa așezarea nucleoproteinei infectante.

Scanned with OKEN Scanner

Cealaltă metodă constă în metalizarea, după tehnicile uzuale, a preparatelor purificate sau parţial purificate de acizi nucleici, depuse pe grile fie prin pulverizare, fie prin metoda picăturii. În general, metalele întrebuinţate sînt : uraniu, crom, platină, aliaje aur-paladiu sau platină-paladiu, nichel. Littauer şi colab. (1960) atrag atenţia asupra faptului că, deşi aliajul de crom-nichel permite obţinerea unui contrast satisfăcător, totuşi granula lui submicroscopică, ale cărei dimensiuni sînt apropiate de cele ale structurilor cercetate, îl face impropriu pentru determinările de mare fineţe. Pentru a înlătura acest inconvenient autorii recomandă utilizarea platinei.

Trebuie menţionat, de asemenea, faptul că examinarea cu microscoape a căror rezoluţie este de 10 Å sau în jurul acestei cifre ridică probleme tehnice speciale. Astfel, pelicula-suport preparată după tehnicile obişnuite nu este întotdeauna convenabilă pentru aceste cercetări. Într-adevăr, aceste membrane pot avea amprente care reprezintă accidentele suprafeţei pe care au fost confecţionate ; acestea pot fi de aceeaşi mărime cu dimensiunile structurilor studiate. De aceea, pentru a evita asemenea confuzii, Hall (1956) a imaginat o nouă metodă de obţinere a peliculei lipsite de desene proprii, metodă care a fost ulterior îmbunătăţită de Littauer şi colab. (1960). În cîteva cuvinte, ea constă în următoarele : Foi de mică, proaspăt clivate, sînt tăiate într-o formă asemănătoare unei lame de microscop. Ele sînt apoi cufundate, pentru scurt timp, într-o soluţie de 0,5 % colodiu în acetat de amil, proaspăt redistilat. După uscare, la temperatura camerei în poziţie verticală şi într-un loc ferit de praf, pelicula de pe suprafaţa foii de mică este dezlipită prin flotare în apă bidistilată. Grilele se depun pe acest film şi sînt apoi culese pe o lamă de sticlă, după o metodă indicată de Hall (1953). Soluţiile care conţin substanţele de cercetat sînt pulverizate pe aceste grile şi preparatele astfel obţinute se usucă la temperatura camerei în cutii Petri. În unele cazuri, suspensiile de cercetat se depun pe film sub formă de picături şi se usucă apoi prin metoda *freezing-dry* (uscare în vid după congelare). Peliculele se protejează şi se întăresc prin depunerea unui strat fin de oxid de siliciu *).

Dificultăţile care survin în momentul dezlipirii filmului de pe mică, în cazul în care metalizarea şi întărirea s-au făcut direct pe suprafaţa lui, au fost îndepărtate de Littauer şi colab. (1960) prin dezlipirea filmului de pe mică, şi, ulterior, pulverizarea, metalizarea şi întărirea lui.

În general, o suprafaţă care a fost obţinută în acest mod este o adevărată replică a suprafeţei netede a micei, lipsită de structură proprie, şi este astfel convenabilă pentru examinarea macromoleculelor cu structură foarte fină.

O altă dificultate rezolvată recent a fost aceea a evitării aglomerării fibrilelor de acizi nucleici pe membrana-suport. Birbeck (1958) şi Birbeck

* Detaliile acestor tehnici pot fi găsite în volumul *Microscopia electronică în biologie şi inframicrobiologie* de R. Portocală şi N. Ionescu, Bucureşti, Edit. Acad. R.P.R., 1962.

și Stacey (1959) au arătat că, dacă ADN este uscat pe un substrat de film obișnuit (formvar sau colodiu), moleculele nu aderă la film, ci se depozitează sub formă de aglomerate în centrul picăturii depuse. Prin utilizarea unui film făcut dintr-un copolimer de stiren cu vinil-piridină, autorii au reușit să demonstreze că moleculele aderă la film și rămîn izolate unele de altele. Copolimerul particular ales a fost unul dintre aceia care au sarcini electrice pozitive la grupările piridinice, aceasta pentru a putea atrage moleculele de acid nucleic, încărcate negativ. Peliculele confecționate din acești copolimeri se obțin prin aceeași tehnică uzuală descrisă de Hall (1956), iar filmul posedă o rezistență mecanică bună și este mult mai stabil în condițiile existente în microscopul electronic.

În cele ce urmează vom examina pe scurt rezultatele obținute de diferiți cercetători în studiul morfologiei ARN.

Littauer și colab. (1960) au întreprins cercetările lor asupra ARN extras din *Escherichia coli* cu ajutorul fenolului. Acidul nucleic era ulterior precipitat cu sulfat de amoniu, apoi resolubilizat, iar soluția obținută era dializată contra soluției cloruro-sodice (fig. 40).

Fotografiile obținute de acești autori arată atît pachete de fibre, cît și fibre individualizate. Tendința de agregare este evidentă în special în centrul și la marginile micropicăturilor, datorită, probabil, tensiunii superficiale. Utilizarea unui pulverizator de mare presiune a permis punerea în evidență a unor fire cu un diametru de 10—13 Å și cu o lungime variabilă, cuprinsă între 200 și 2 000 Å (cu un maxim de distribuție cuprins între 200 și 600 Å). Dimpotrivă însă, întrebuințarea unui pulverizator de joasă presiune a pus în evidență fire al căror diametru era tot de 10—13 Å, dar cu o lungime medie mai mare (1 200—4 000 Å). Rezultatele diferite obținute în privința lungimii firelor se datoresc ruperii mecanice a macromoleculelor, fapt confirmat prin ultracentrifugare și cercetarea constantelor de vîscozitate. Ocazional, pe unele preparate au fost observate granule plate cu un diametru de 400—600 Å, pe care autorii le consideră ca fiind o altă formă a ARN.

Examinarea ARN suspendat într-o soluție de acetat de amoniu a arătat că firele au devenit rare și că imaginile electronice sînt dominate de diferite forme de agregare, precum și de granule.

Pe preparatele obținute după uscare prin *freezing-dry* apare o formă particulară de agregare care nu a putut fi pusă în evidență în cazul în care preparatele erau uscate la temperatura camerei. Firele sînt pe aceste preparate, agregate atît longitudinal, cît și transversal, ceea ce indică un înalt grad de organizare. Acest fapt ar putea fi atribuit, după părerea autorilor, unui fenomen de cristalizare. Prin modificarea pH-ului între 6 și 9, Littauer și colab. nu au putut obține modificări nici în ceea ce privește forma moleculelor de acid nucleic și nici în natura acestei agregări.

Digestia cu RN-ază face să dispară de pe preparatele examinate după acest tratament atît filamentele, cît și formele granulare plate.

Scanned with OKEN Scanner

Autorii consideră că au avut posibilitatea de a observa firele izolate datorită, probabil, faptului că au utilizat soluţii apoase. Această concluzie se impune după întrebuinţarea soluţiilor saline, care determină apariţia pe preparate a granulelor şi dispariţia fibrelor. Cercetările lui Littauer sînt, pe de altă parte, în concordanţă cu părerile unanim admise astăzi că ARN este reprezentat printr-o moleculă cu o mare capacitate de spiralare.

Terada (1958), studiind ARN de origine bacteriană (tulpina acido-rezistentă Kedrowsky), ajunge la concluzia că firele au un diametru de 14—17 Å şi o lungime variabilă.

ARN de origine virală a fost studiat din punct de vedere morfologic numai în cazul virusurilor mozaicului tutunului şi gripei.

De prima problemă s-au ocupat mai mulţi cercetători. Încă din 1955 Schramm şi colab. (1955) au publicat imagini ale virusului mozaicului tutunului parţial degradat. Pe fotografiile obţinute se pot vedea, ieşind din interiorul cilindrului de proteină al virusului mozaicului fire, pe care autorii le consideră filamente de ARN liber.

Un an mai tîrziu, Schuster şi colab. (1956) au publicat fotografii ale ARN extras cu ajutorul fenolului tot din virusul mozaicului tutunului. ARN, puternic polimerizat, se prezintă sub formă de filamente lungi, sinuoase, cu un diametru variabil. Cele mai subţiri fire care mai pot fi vizibile au, după părerea autorilor, un diametru de 15 Å. Este de notat, de asemenea, tendinţa la agregare pe care o prezintă aceste filamente în cursul uscării preparatelor, tendinţă semnalată şi de Schramm şi Gierer (1957), şi care împiedică determinarea cu exactitate a diametrului fibrelor de ARN (fig. 41).

De altfel, lipsa de rigiditate a lanţurilor polinucleotidice ale ARN a fost confirmată de Boedtker (1959) prin alte metode, ca : ultracentrifugarea, vîscozimetria şi difuzia luminii.

Hall (1958) a studiat de asemenea morfologia ARN extras din VMT şi a găsit că filamentele acestui compus au un diametru de 30 Å. Pentru a explica această discordanţă dintre datele înregistrate de el şi cele obţinute de ceilalţi autori, Hall emite ipoteza după care fibrele îşi pot mări diametrul aparent datorită spiralării lor. Datele electronooptice sînt în concordanţă cu cele obţinute cu ajutorul analizei cu raze X. Rezultatele obţinute de Franklin (1956) cu această din urmă metodă au arătat că VMT se prezintă sub forma unui cilindru găurit în interior, ale cărui diametre exterioare şi interioare sînt de 170 Å şi respectiv 40 Å. ARN din interiorul cilindrului este împachetat strîns în învelişul de proteină al virusului.

Aspectul morfologic al ARN extras cu ajutorul fenolului din virusul gripal a fost studiat de Portocală şi colab. (1961). Pe preparate obţinute înainte de terminarea extracţiei fenolice şi înainte ca toţi corpusculii virali să fie complet dezintegraţi s-a reuşit să se pună în evidenţă numeroase mănunchiuri de filamente. Filamentele cele mai fine, încă vizibile, au un

Fig. 40. — Acid ribonucleic extras din *E. coli*. Preparat obținut prin metoda „freezing-dry". Metalizare crom-nichel. Mărire 60 000 × (după Littauer și colab., 1960).

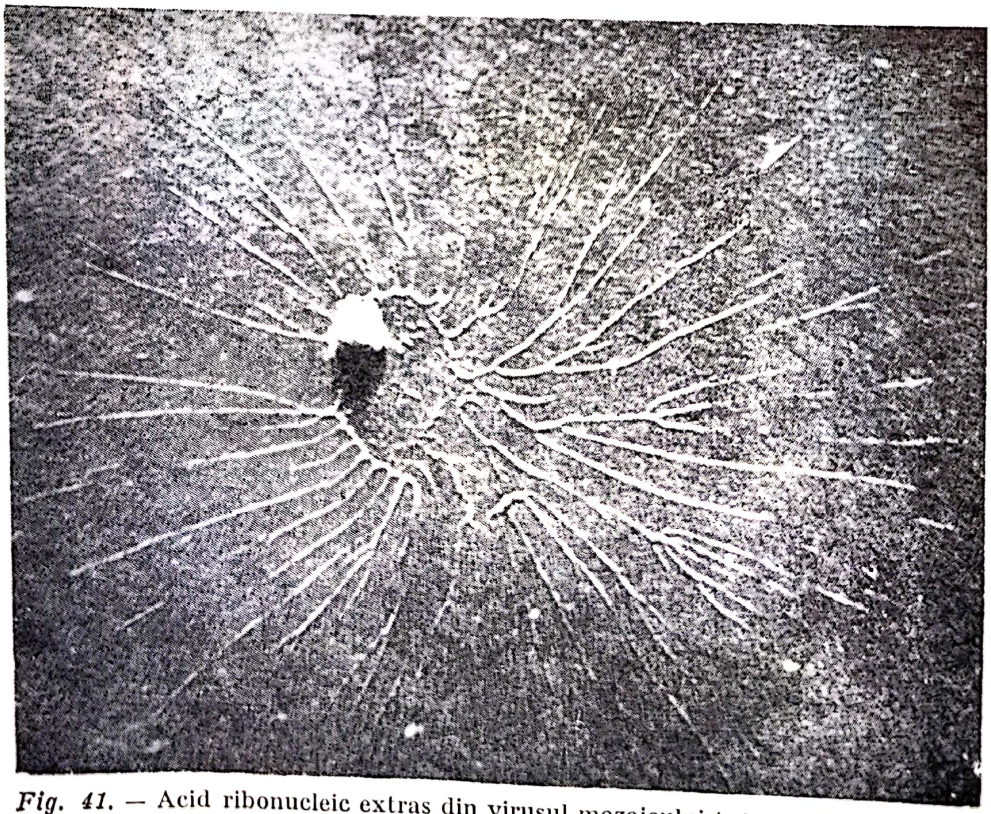


Fig. 41. — Acid ribonucleic extras din virusul mozaicului tutunului. Metalizare Pt-Rh. Mărire 20 000 × (după Schuster și colab., 1956).

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 42. — Filamente de acid ribonucleic gripal infectant. Din corpusculi elementari cu morfologia profund alterată ies filamente de acid ribonucleic. Metalizare Au-Pd. Mărire 25 000 × (după Portocală și colab., 1961).

Scanned with OKEN Scanner

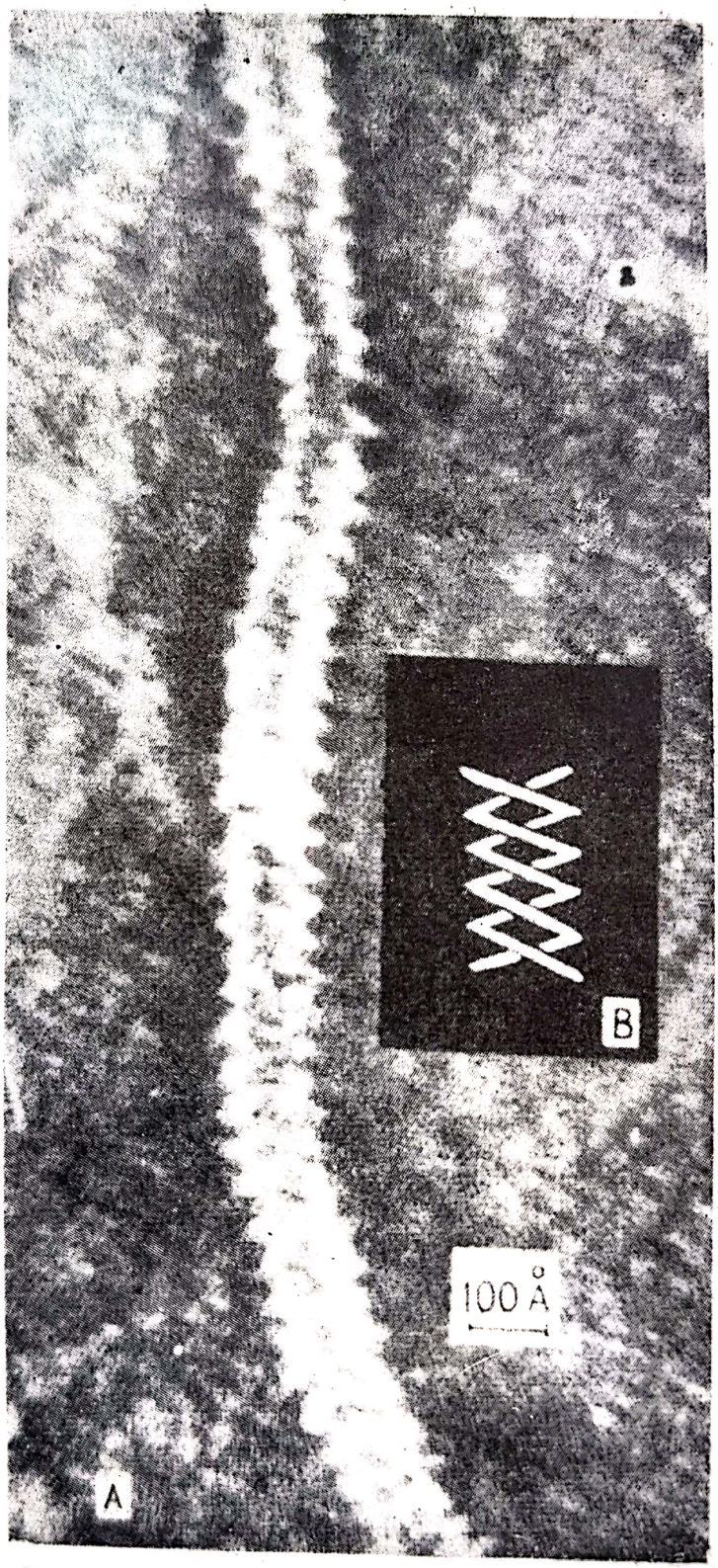


Fig. 43. — Componenta internă a virusului Sendai, care sugerează un aranjament dublu elicoidal (*A*). Colorare cu A.P.T. Mărire 750 000 ×. În (*B*) o diagramă care sugerează aranjamentul posibil ai structurii lanţurilor nucleoproteice de-a lungul axei (după Horne şi Waterson, 1960).

Scanned with OKEN Scanner

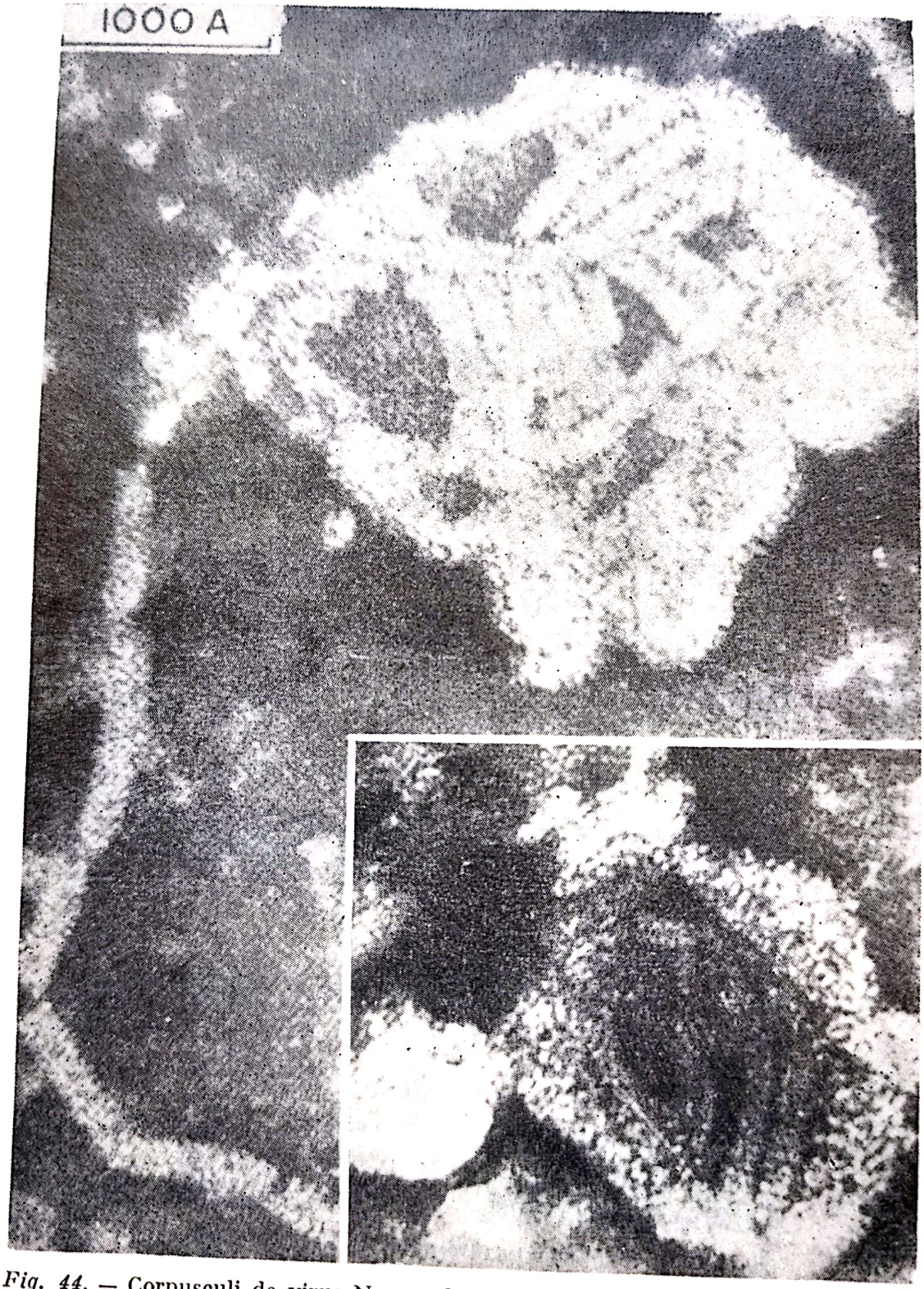


Fig. 44. — Corpusculi de virus Newcastle, parțial dezintegrați, în care se observă componenta internă. Colorare cu A.P.T. Mărire 270 000 × (după Horne și colab., 1960).

Scanned with OKEN Scanner

diametru ninim de 30 Å. Autorii consideră că această cifră se datorește, probabil, alipirii în grosime a două fire de cîte 15 Å fiecare. Aceste din urmă filamente nu au putut fi observate, deoarece microscopul electronic cu care s-a lucrat nu avea o putere de rezoluție suficientă pentru a permite aceasta. Tot datorită acestui fapt, autorii arată că nu au putut pune în evidență filamentele de ARN la sfîrșitul extracției, cînd firele suferă, probabil, o desfacere în subunități mai mici, pentru care rezoluția microscopului folosit nu este suficientă. De menționat că, în toate aceste cazuri, soluțiile de ARN își păstrau caracterul lor infectant (fig. 42).

Horne și Waterson (1960) au examinat cu ajutorul microscopului electronic nucleoproteine extrase din virusurile urlian, Newcastle și Sendai, parțial degradate cu eter. Aceste virusuri au fost studiate cu tehnica imaginată de Brenner și Horne (1959) de colorare negativă a corpusculilor elementari parțial dezintegrați.

În cazul virusului oreionului, nucleoproteina are un diametru de 170 Å și o periodicitate de-a lungul axei de 50 Å. Anumite porțiuni relevă existența, în aceste filamente, a unui miez central de 40 Å.

Structuri similare au fost observate pe preparatele care conțineau virusul Sendai. În acest caz, fotografiile sugerează mai evident că periodicitatea se datorește unui aranjament elicoidal cu două ramuri care intersectează axul elicei (fig. 43).

Particulele virusului Newcastle au arătat imagini asemănătoare (fig. 44).

Într-o altă lucrare asupra structurilor mixovirusurilor, Horne și colab. (1960) atrag atenția asupra faptului că ribonucleoproteina este formată dintr-un număr de subunități aranjate în formă de elice și că existența unei duble elice la virusul Sendai determină, probabil, o rigiditate mai mare a structurii formațiunii examinate.

Din datele expuse mai sus rezultă că examenul electronooptic al filamentelor de ARN a arătat, pentru acestea, o lungime variabilă și un diametru de 10—17 Å.

Rezultatele obținute de unii autori, și care se îndepărtează de aceste cifre, sînt probabil rezultatul agregării a două sau mai multe filamente, ceea ce conduce la valorile amintite mai înainte.

Datele obținute cu ajutorul secțiunilor ultrafine ale celulelor și virusurilor întregesc tabloul prezentat mai sus asupra morfologiei acizilor nucleici. În acest caz însă, datorită particularităților acestei metode — expuse de unul dintre noi cu altă ocazie (Portocală, 1958) — imaginile sînt diferite de cele descrise mai înainte.

Astfel, Morgan și colab. (1956) au arătat pe secțiuni, în cazul virusului gripal, existența unei regiuni centrale opace pentru electroni, înconjurată de o zonă mai puțin densă. După părerea autorilor, miezul central corespunde antigenului G care conține ARN.

Scanned with OKEN Scanner

Amos H., Korn M. (1958), Biochim. biophys. Acta, **29**, 444.
Arvidson H., Eliosson N. A., Hammersten E., Reichard P., von Ubich H., Bergström S. (1949), J. biol. Chem., **179**, 169.
Baddiley J., Clark V. M., Michalski J. J., Todd A. R., (1949 *a*), J. chem. Soc., 815.
Baddiley J., Michelson A. M., Todd A. R., (1949 *b*), J. chem. Soc., 582.
Baddiley J., Todd A. R., (1947), J. chem. Soc., 648.
Bachrach H. L. (1964), J. mol. Biol., **8**, 348.
Bachrach H. L. (1965), Virology, **25**, 532.
Beaven G. H., Holday E. R., Johnson A. E. (1955), în *Nucleic acids*, sub red. E. Chargaff, J. N. Davidson, Academic Press, New York, vol. I, p. 531.
Birbeck M. S. C. (1958), Lucrările celui de-al IV-lea Congres internațional de microscopie electronică, Berlin, **1**, 377.
Birbeck M. S. C., Stacey K. A. (1959), J. biophys. biochem. Cytol., **5**, 167.
Boedtker H. (1959), Biochim. biophys. Acta, **32**, 519.
Brenner S., Horne R. W. (1959), Biochim. biophys. Acta, **34**, 103.
Brown D. M., Magrath D. I., Todd A. R. (1952), J. chem. Soc., 2 708.
Brown D. M., Todd A. R. (1952), J. chem. Soc., 52.
Brown D. M., Todd A. R. (1953), J. chem. Soc., 2 040.
Brown D. M., Todd A. R. (1955), în *Nucleic acids*, sub red. E. Chargaff, J. N. Davidson, Academic Press, New York, vol. I, p. 409.
Buchanan M. I. (1960), în *The nucleic acids*, Academic Press, New York, vol. III, p. 303.
Carter C. E., Cohn W. E. (1949), Fed. Proc., **8**, 190.
Cavalieri L. F., Brown G. B. (1949), J. amer. chem., Soc., **71**, 2 243.
Cavalieri L. F., Kerr S. E., Angelos Al. (1951), J. amer. chem. Soc., **73**, 2 567.
Chambers R. W., Khorana H. G. (1958), J. amer. chem. Soc., **80**, 3 749.
Chambers R. W., Moffat J. B. (1958), J. amer. chem. Soc., **80**, 3 752.
Chambers R. W., Moffat J. G., Khorana H. G. (1957), J. amer. chem. Soc., **79**, 3 747.
Cohn W. E. (1950), J. amer. chem. Soc., **72**, 2 811.
Cohn W. E., Volkin E. (1951), Nature, **167**, 483.
Cohn W. E., Volkin E. (1952), Arch. Biochem. Biophys., **36**, 465.
Cox R. A., Littauer U. Z. (1960), J. mol. Biol., **2**, 166.
Cox R. A., Littauer U. Z. (1962), Biochim. biophys. Acta, **61**, 197.
Cox R. A., Littauer U. Z. (1963), Biochim. biophys. Acta, **78**, 188.
Cox R. A., Arnstein Hrv., (1963), Biochem., J., **89**, 574.
Crosbie C. W. (1960), in *The nucleic acids*, Academic Press, New York, vol. III, p. 393.
Crosbie C. W., Smellie R. M. S., Davidson J. N. (1953), Biochem. J., **54**, 287.
Crothers D. M., Zimm B. H. (1964), J. mol. Biol., **9**, 1.
Davis F. F., Carlucci A. F., Roubein I. F. (1959), J. biol. Chem., **234**, 1 525.
Davoll J., Lythgoe B., Todd A. R. (1948), J. chem. Soc., **967**, 1 685.
Doty P., Boedtker H., Fresco J. R., Haselkorn R., Litt M. (1959), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **35**, 782.
Dunn D. B. (1961), Biochim. biophys. Acta, **46**, 198.
Dvorkin G. A., Spirin A. S. (1960), Dokladî Akad. Nauk SSSR, **135**, 987.
Elson D., Chargaff E., (1952), *Phosphorus metabolism*, sub red. W. E. McElroy, B. Glass, Johns Hopkins Press, Baltimore, vol. II, p. 239.
Elson D., Chargaff E. (1954), Nature, **173**, 1 037.
Faulkner P., Martin E. M., Sved S., Valentine R. C., Work T. S. (1961), Biochem. J., **80**, 597.
Fischer E., Helferich B. (1914), Chem. Ber., **47**, 210.
Fischer E., Roeder G. (1901), Chem. Ber., **34**, 3 751.
Fletcher W. E., Gulland J. M., Jordan D. O. (1944), J. chem. Soc., **33**, 47.
Franklin R. E. (1956), Nature, **177**, 928.
Fresco J. R., Alberts B. M., Doty P. (1960), Nature, **188**, 98.
Fresco J. R., Lesk A. M., Gorn R., Doty P. J. (1961), J. amer. chem. Soc., **83**, 3 155.

Scanned with OKEN Scanner

Gavrilova I. P., Spirin A. D., Belozerski A. N. (1959), Dokladî Akad. Nauk SSSR, **126**, 1 121.
Geiduschek P. (1962), J. mol. Biol., **4**, 467.
Geiduschek E. P., Herskovits T. T. (1961), Arch. Biochem. Biophys., **65**, 99.
Gibbs J. A., Di Marzio E. A. (1959), J. chem. Phys., **30**, 271.
Hall C. E. (1953), *Introduction to electron microscopy*, McGraw Hill Company, New York, 315.
Hall C. E. (1956), J. biophys. biochem. Cytol., **2**, 625.
Hall C. E. (1958), Proc. IV-th Intern. Congr. Biochem., **6**, 90.
Hamaguchi K., Geiduschek E. P. (1962), J. amer. chem. Soc., **84**, 1 329.
Hartmann S. C., Buchanan J. M. (1959), Ann. Rev. Biochem., **28**, 365.
Hartmann G., Coy U. (1961), Biochim. biophys. Acta, **47**, 612.
Haselkorn R., Doty P. (1961), J. biol. Chem., **236**, 2 798.
Hecht L. I., Stephenson M. L., Zamecnik P. C., (1959), Proc. nat. Acad. Sci., Wash., **45**, 505.
Helmkamp G. K., Ts'o P. O. P. (1961), J. amer. chem. Soc., **83**, 138.
Heppel L. A., Hilmoe R. I. (1953), Fed. Proc., **12**, 217.
Holley R. W., Apgar J., Everett G. A., Madison J. T., Marquisse M., Merill S. H., Penswick J. R., Zamir A. (1965), Science, **147**, 1 462.
Horne R. W., Waterson A. P. (1960), J. mol. Biol., **2**, 75.
Horne R. W., Waterson A. P., Wildy P., Farnham A. E. (1960), Virology, **11**, 79.
Howard G. A., Lythgoe B., Todd A. R. (1947), J. chem. Soc., 1 052.
Katz S., Comb D. (1963), J. biol. Chem., **9**, 238.
Kauzmann W. (1959), Advanc. Protein Chem., **14**, 1.
Kenner G. W., Taylor C. W., Todd A. R. (1949), J. chem. Soc., 1 620.
Khouvine Y., Robichon-Szulmajster H. (1952), Bull. Soc. Chim. biol., **34**, 105.
Klotz I. M., Frazen J. S. (1962), J. amer. chem. Soc., **84**, 3 461.
Knight C. A. (1952), J. biol. Chem., **197**, 241.
Koerner J. F., Varadarajan S. (1960), J. biol. Chem., **235**, 2 688.
Kossel A. (1883—1884), Z. physiol. Chem., **8**, 404.
Kossel A. Z. (1886), Z. physiol. Chem., **10**, 248.
Kunitz M. (1940), J. gen. Physiol., **24**, 15.
Levenberg B., Buchanan J. M. (1957), J. biol. Chem., **224**, 1 019.
Levene P. A., Bass L. W. (1931), în *Nucleic acids*, Chemical catalog Company, New York.
Levene P. A., Harris S. (1932), J. biol. Chem., **98**, 9.
Levene P. A., Iacobs W. (1909), Chem. Ber., **42**, 2 102.
Levene P. A., Mandel H. (1908), Chem. Ber., **41**, 1 905.
Levene P. A., Simms H. S. (1926), J. biol. Chem., **70**, 327.
Lipkin D., Talbert P. T. (1955), Chem. and Ind. (Londra), 52.
Littauer U. Z., Danon D., Marikovski Y. (1960), Biochim. biophys. Acta, **42**, 435.
Littlefeld J. W., Dunn D. B. (1958), Biochem., J., **70**, 642.
Lohmann K. (1931), Biochem. Z., **233**, 460.
Lukens L. N., Buchanan J. M. (1957), J. amer. chem. Soc., **79**, 1 511.
Mahler H. R., Pereira A. Do S. (1962), J. mol. Biol., **3**, 325.
Markham R., Smith J. D. (1952), Biochem. J., **52**, 552.
Mathews F. S., Rich A. (1964), J. mol. Biol., **8**, 89.
Michelson A. M. (1963), *The chemistry of nucleosides and nucleotides*, Academic Press, New York— Londra, p. 98.
Michelson A. M., Todd A. R. (1949), J. chem. Soc., 2 487.
Michelson A. M. (1958), J. chem. Soc., 1957.
Morgan C., Rose H. M., Moore D. H. (1956), J. exp. Med., **104**, 171.
Nonoyama M., Ikeda I. (1964), J. mol. Biol., **9**, 763.
Popa L., Portocală R. (1966), St. cerc. biochim. (sub tipar).
Popa L., Cruceanu I. (1966), rezultate nepublicate.
Popa L., Cruceanu I., Lăcătuș V. (1966 *b*), Simpozion de biofizică și biochimie, Sofia (sub tipar).
Popa L., Lăcătuș V., Cruceanu I. (1966 *c*), A III-a Conferință Republicană de chimie, Timișoara (sub tipar).
Portocală R. (1958), Microbiol. parazitol. epidemiol., *3*, 193.

Portocală R., Ionescu N., Dumitrescu S., Boeru V., Samuel I. (1961), St. cerc. inframicrobiol., **12**, 309.
Portocală R., Popa L., Samuel I., Prahoveanu E. (1963), St. cerc. inframicrobiol, **14**, 697.
Portocală R., Samuel I. (1963), St. cerc. inframicrobiol., *3*, 269.
Preiss J., Dieckmann M., Beig P. J. (1961), J. biol. Chem., **236**, 1 748.
Pullman B., Pullman A. (1959), Biochim. biophys. Acta, **36**, 343.
Rawitscher M. A., Ross P. D., Sturtevant J. M. (1963), J. amer. chem. Soc., **85**, 1 915.
Reichard P., Lagerkvist U. (1953), Acta chem. scand., **7**, 1 207.
Reichard P. (1955), în *Nucleic acids* sub red. E. Chargaff, J. N. Davidson, Academic Press, New York, vol. II, p. 285.
Rich A., Davies D. (1956), J. amer. chem. Soc., **76**, 3 548.
Rich A., Davies D., Crick F. H. C., Watson J. A. (1961), J. mol. Biol., **3**, 71.
Ross P. D., Sturtevant J. M. (1960), Proc. nat. Acad. Sci., Wash., **46**, 1 360.
Sarkar N. K. (1962), Biochim. biophys. Acta, **55**, 233.
Schaffer F. L., Moore H. F., Schwerdt C. E. (1960), Virology, **10**, 530.
Schramm G., Gierer A. (1957), Special Public., N. Y. Acad. Sci., **5**, 229.
Schramm G., Grötsch H., Pullmann W. (1961), Angew. Chem., **73**, 619.
Schramm G., Schumacher G., Zillig W. (1955), Z. Naturforsch., **10**, 481.
Schuster H., Schramm G., Zillig W. (1956), Z. Naturforsch., **11**, 339.
Seeds W. (1953), Biochem. biophys. J., **3**, 27.
Smellie R. M. S. (1963), în *Progress in nucleic acids research*, sub red. J. N. Davidson, W. E. Cohn, Academic Press., New York, vol. I, p. 27.
Smith J. D., Dunn D. B. (1959), Biochem. J., **72**, 294.
Spencer M., Fuller W., Wilkins M. H. F., Brown G. L. (1962), Nature, **194**, 1 014.
Spirin A. S. (1960), J. mol. Biol., **2**, 436.
Spirin A. S. (1961), Biohimiia, **26**, 511.
Spirin A. S. (1962), în *Acides ribonucléiques et polyphosphates*, C.N.R.S., Paris, p. 73.
Spirin A. S. (1963), în *Progress in nucleic acides research*, Academic Press, New York, vol. I, p. 301.
Spirin A. S., Gavrilova L. P., Belozerski A. N. (1959), Dokladî Akad. Nauk SSSR, **125**, 658.
Staehelin M. (1961), Biochim. biophys. Acta, **49**, 11, 20, 27.
Staehelin M. (1962), în *Acides ribonucléiques et polyphosphates*, C.N.R.S., Paris, p. 247.
Sturtevant J. M., Rice S. A., Geiduschek E. P. (1958), Disc. Faraday Soc., **25**, 138.
Szer W., Shugar D. (1961), Acta biochem. Polon., **8**, 235.
Tamm C., Hodes M. E., Chargaff E. (1952), J. biol. Chem., **195**, 49.
Tanaka K. (1960), J. Biochem. (Japonia), **47**, 398.
Terada M. (1958), Lucrările celui de-al IV-lea Congres internaţional de microscopie electronică, Berlin, **2**, 115.
Traube W. (1904), Ann. Chem., **331**, 64.
Uryson S. O., Belozerski A. N. (1959), Dokladî Akad. Nauk SSSR, **125**, 1 144.
Voe de H., Tinoco I. Jr. (1962), J. mol. Biol., **4**, 500.
Volkin E., Carter C. E. (1954), J. Amer. chem. Soc., **73**, 434.
Volkin E., Cohn W. E. (1953), J. biol. Chem., **203**, 319.
Volkin E., Cohn W. E. (1952), Fed. Proc., **11**, 303.
Warren L., Buchanan J. M. (1957), J. biol. Chem., **229**, 613.
Watson J. D., Crick F. H. C. (1953), Nature, **171**, 737.
Weismann C., Borst P. (1963), Science, **142**, 1 188.
Wheeler W. L., Johnson T. B. (1903), Amer. Chem. J., **29**, 492.
Zachan G., Acs G., Lipmann F. (1958), Proc. nat. Acad. Sci., Wash., **44**, 885.
Zubay G. (1962), J. mol. Biol., **4**, 347.
Zubay G. (1963), Science, **140**, 1 092.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 2

HIDROLIZA ACIZILOR RIBONUCLEICI

Hidroliza alcalină

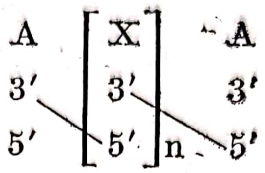
Stendel şi Peiser (1922) şi apoi Levene (1923) au arătat că ARN tratat cu reactivi alcalini este convertit într-un amestec de mononucleotide. Aceste observaţii au fost ulterior confirmate cu ajutorul metodelor moderne de analiză, printre care: cromatografia (Chargaff şi colab., 1950; Markham şi Smith, 1951) şi electroforeza pe hîrtie (Davidson şi Smellie, 1952). La aceeaşi concluzie s-a ajuns şi prin utilizarea analizei cromatografice pe coloană a hidrolizatului alcalin de ARN (Cohn, 1950).

În ceea ce priveşte concentraţia alcalilor întrebuinţaţi, s-a observat că soluţia normală de NaOH produce, în 18 ore, la 23°C, hidroliza totală a ARN obţinîndu-se un amestec de nucleozid-*2'* şi *3'*-monofosfaţi izomeri (Markham şi Smith, 1951). Cantitatea acestora în hidrolizat este în general apropiată de valoarea calculată teoretic; proporţia izomerilor este de aproximativ 40% nucleozid-*2'*-fosfat faţă de 60% nucleozid-*3'*-fosfat (Volkin şi Carter, 1951). În acelaşi timp însă, Marrian şi colab. (1951) au remarcat că soluţiile normale de alcali produc o dezaminare parţială a acidului citidilic. După aceşti din urmă autori, hidroliza alcalină a ARN se realizează în bune condiţii numai cu alcali în concentraţie de 0,3 N, fapt confirmat şi de Davidson şi Smellie (1952). Ultimii recomandă pentru hidroliza alcalină soluţia de KOH 0,3 N, care este lăsată să acţioneze timp de 18 ore la 37°C. La sfîrşitul hidrolizei, potasiul se îndepărtează sub formă de perclorat prin neutralizare cu $HClO_4$. Condiţiile acestea de lucru au rămas şi astăzi cele mai indicate pentru studiul compoziţiei ARN.

Analiza produşilor de hidroliză a ARN a scos în evidenţă prezenţa în cantitate mică şi variabilă a nucleozid-difosfaţilor şi a nucleozidelor alături de nucleozid-monofosfaţii care se formează întotdeauna în cantitate mare. Din aceste observaţii s-a dedus că, în timp ce nucleozid-monofosfaţii rezultă din interiorul lanţului polinucleotidic, nucleozid-difosfaţii, ca şi nucleozidele, provin de la capetele moleculei de ARN.

Astfel, Matthews şi Smith (1957) au găsit că ARN din VMT conţine mai puţin de un nucleozid-difosfat pentru 1 000 de nucleotide. Pe de altă

parte, Fraenkel-Conrat şi colab. (1962) au demonstrat că un mol de ARN din VMT conţine 0,4 pînă la 1,5 moli de nucleozide. De aici autorii conchid că ambele capete ale moleculei se termină cu adenozină (A), ca în schema de mai jos:



După Markham şi colab. (1954), hidroliza alcalină a unui polinucleotid de tipul:

pX′pXpXpXpX.... pXpX″

conduce la obţinerea următorilor produşi de reacţie:

a) Un amestec de nucleozid *2′,5′* şi *3′,5′* difosfaţi (pXp), care provin de la începutul lanţului macromolecular.

b) Un nucleozid (X″), care provine de la capătul moleculei.

c) Un amestec de nucleozid *2′,3′* monofosfaţi (Xp), care provin din restul moleculei.

Schema prezentată corespunde unui caz particular cînd lanţul polinucleotidic este fosforilat la hidroxilul ribozei din poziţia $C_{5'}$.

ARN din VMT, despre care s-a amintit mai sus, corespunde unui alt model special. Hidroliza alcalină a acestui ARN va determina apariţia numai a nucleozidelor şi a nucleozid *2′* şi *3′* monofosfaţilor în produşii de reacţie. Primii provin de la capetele moleculei, în timp ce ultimii din interiorul lanţului.

Din analiza rezultatelor prezentate pînă aici se poate ajunge la concluzia că hidroliza alcalină oferă atît informaţii asupra compoziţiei totale în nucleotide a lanţului macromolecular, cît şi asupra nucleozidelor aflate la cele două capete ale moleculei. În timp ce determinarea conţinutului în nucleotide se poate face uşor cu ajutorul metodei cromatografice sau electroforetice, cantitatea lor fiind întotdeauna suficientă pentru analiză, determinarea nucleozidelor terminale întîmpină dificultăţi datorită concentraţiei lor extrem de mici în hidrolizatele alcaline.

Pentru a da un exemplu asupra dificultăţii problemelor ridicate de determinarea nucleozidelor terminale este suficient să arătăm că, în cazul moleculei de ARN din VMT, care conţine aproximativ 6 400 de nucleotide, determinarea celor două nucleozide terminale este o sarcină într-adevăr greu de rezolvat.

Studiul structurii compuşilor rezultaţi în urma hidrolizei alcaline a ARN a permis să se cunoască natura legăturilor internucleotidice şi să se obţină informaţii asupra structurii moleculei acestui compus (Brown şi Todd, 1952*a*).

Astfel, un polinucleotid de tipul (*A*) conduce prin hidroliza alcalină întotdeauna la produşii (*B*), (*C*) şi (*D*), deoarece alcalii scindează exclusiv legătura $C_5—O—P$ în locul notat prin săgeată în figura 45. Din această cauză, analiza produşilor de reacţie de hidroliză oferă posibilitatea de a cunoaşte o parte din legăturile existente în interiorul lanţului macromolecular. Produşii de reacţie ai polinucleotidului (*A*) vor fi prin urmare:

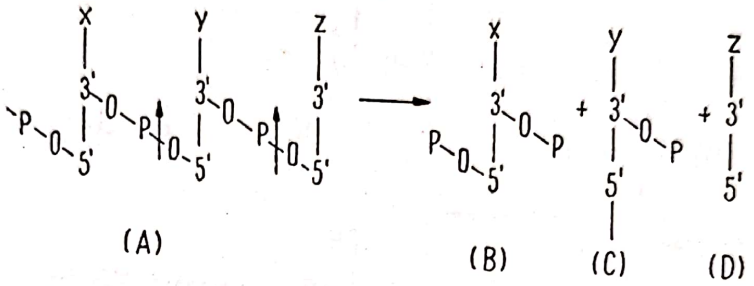


Fig. 45. — Legăturile scindate de alcali, în cazul unui fragment polinucleotidic (*A*), precum şi produşii rezultaţi (*B*), (*C*), (*D*).

nucleozid-*3'*,*5'*-difosfaţi (*B*) proveniţi de la unul din capete, nucleozid-*3'*-monofosfaţi (*C*) din interiorul lanţului şi nucleozide (*D*) de la al doilea capăt.

Mecanismul hidrolizei alcaline. Mecanismul de acţiune a bazelor asupra ARN a început să fie cunoscut o dată cu apariţia lucrărilor lui Brown şi Todd (1952 *b*, 1955), Markham şi Smith (1955), Brown şi colab. (1956).

După aceşti autori, desfacerea legăturii *3'*,*5'*-internucleotidice sub influenţa alcalilor are loc întotdeauna în dreptul legăturii $C_5—O—P$. În prima etapă are loc o transesterificare cu formarea unui diester-*2'*,*3'* ciclic la un produs intermediar, care în etapa a doua a hidrolizei suferă desfacerea legăturii *2'* sau *3'* pentru a trece într-un amestec de *2'* şi *3'* monoesteri (nucleozid-*2'* sau *3'*-monofosfaţi). Aceştia din urmă reprezintă produşii finali ai hidrolizei alcaline.

Dacă se reprezintă schematic, ca în figura 46, un ARN prin *I*, cele două etape ale hidrolizei alcaline pot fi redate prin formulele *A* şi *B*. Săgeţile reprezintă locul în care alcalii produc desfacerea legăturilor.

Formarea esterilor-2',3' ciclici. În soluţii neutre, legătura *3'*,*5'* diesterică (*I*) este stabilă datorită faptului că atît electrofilicitatea grupării fosforice, cît şi nucleofilicitatea grupei *2'*-OH sînt scăzute. Prin adăugarea ionilor de OH^- la soluţia de ARN, aceştia îndepărtează protonul de la grupa *2'*-OH, iar anionul alcoolic care ia naştere în acest fel, avînd oxigenul puternic nucleofil, poate ataca gruparea fosforică slab electrofilă. De aici rezultă că întregul sistem trece într-o stare activată (*II*) (fig. 47).

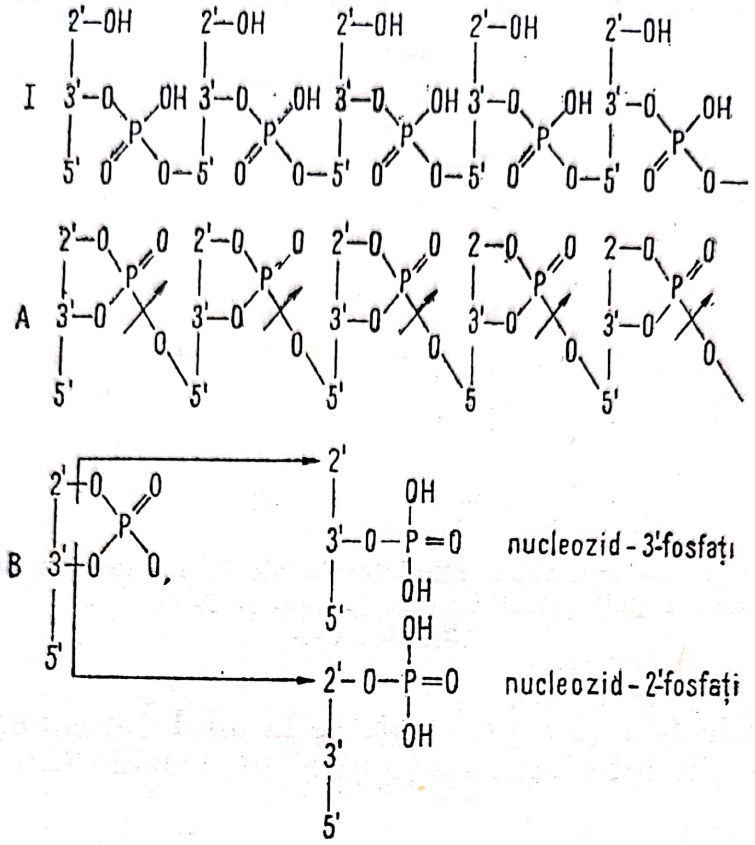


Fig. 46. — Etapele hidrolizei alcaline. În prima etapă are loc transesterificarea cu formarea diesterilor ciclici (*A*), iar în a doua etapă desfacerea legăturii *2'*- sau *3'*-esterice și obținerea produșilor finali (*B*).

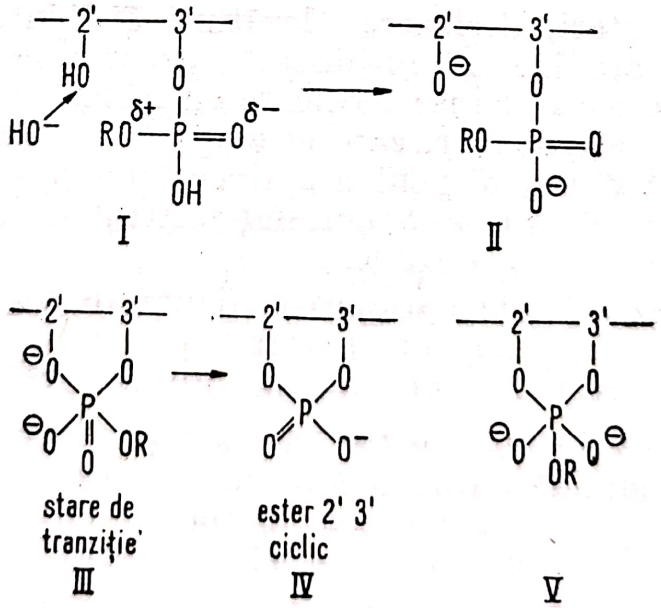


Fig. 47. — Mecanismul formării esterilor *2', 3'*-ciclici în cursul hidrolizei alcaline (după Witzel, 1963).

Dintre toate legăturile fosforului, cea mai accesibilă atacului nucleofilic este legătura *5'*-esterică. Conform principiului reacţiei de substituţie nucleofilă SN_2, atacul oxigenului din poziţia *2'* va avea loc în spatele legăturii cu cea mai slabă densitate de electroni. Or, situaţia aceasta se întîlneşte numai în spatele celor două legături esterice, deoarece atomii de oxigen liberi aflaţi în rezonanţă sînt încărcaţi negativ (Witzel, 1963).

Pe de altă parte, dintre cele două legături esterice numai legătura *5'*-esterificată este accesibilă din punct de vedere steric, astfel că starea activată (*II*) va conduce în mod obligatoriu prin starea de tranziţie (*III*) la esterul *2',3'*-ciclic (*IV*). Deoarece între produşii de hidroliză alcalină a *3',5'*-nucleozid-difosfaţilor nu s-au găsit compuşi *2',5'*-fosforilaţi (Brown şi colab., 1956), formarea unui intermediar (*V*) cu un fosfor pentacovalent este puţin probabilă.

Formarea produşilor finali ai reacţiei de hidroliză alcalină (nucleozid-2' şi 3'-fosfaţi). Este important de subliniat faptul că diesterii-*2',3'*-ciclici rezultaţi în prima etapă sînt stabili în soluţii neutre. În prezenţa ionilor de OH^- însă, ei sînt transformaţi într-un amestec de nucleozid-*2'* şi *3'*-fosfaţi.

Şi în acest caz atacul ionilor de OH^- se realizează tot după principiul reacţiei de substituţie nucleofilică (SN_2). Formarea produşilor finali are loc tot prin intermediul unei stări de tranziţie. Spre deosebire însă de cazul discutat mai sus, al *3'*-diesterilor, cînd gruparea nucleozidică care atacă este fixă şi astfel este constrînsă din punct de vedere steric la posibilitatea de a ataca numai spatele legăturii *5'*-esterice, ionii de OH^-, fiind liberi, pot ataca diesterii *2',3'*-ciclici (*IV*) în egală măsură în spatele legăturii *2'*- sau *3'*-esterice. Ca rezultat se obţine un amestec format din nucleozid-*2'* şi *3'*-fosfaţi (fig. 48).

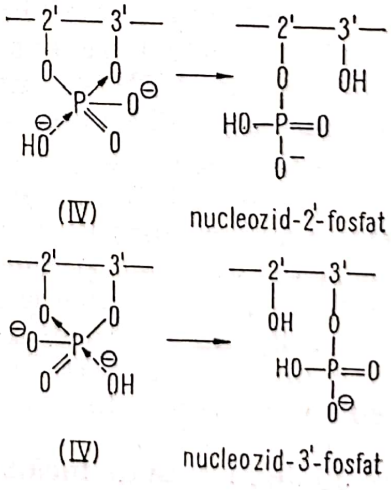


Fig. 48. — Mecanismul formării produşilor finali ai reacţiei de hidroliză alcalină (după Witzel, 1963).

Hidroliza acidă

Spre deosebire de alcalii care au o acţiune specifică asupra legăturilor internucleotidice ale ARN eliberînd cantitativ mononucleotidele, efectul acizilor este mult mai complicat. Ei produc scindarea legăturilor internucleotidice, dar mai ales a legăturilor N-ribozidice ale componentelor purinice. Rezultă din aceasta că produşii hidrolizei acide sînt adenina şi guanina, nucleotide pirimidinice, fosfor şi riboză.

Astfel, un ARN reprezentat schematic în figura 49 *A* se va scinda în timpul hidrolizei acide de preferinţă în dreptul legăturilor arătate prin săgeţi. În această formulă, *Pu* reprezintă o bază purinică, iar *Pi* o bază pirimidinică.

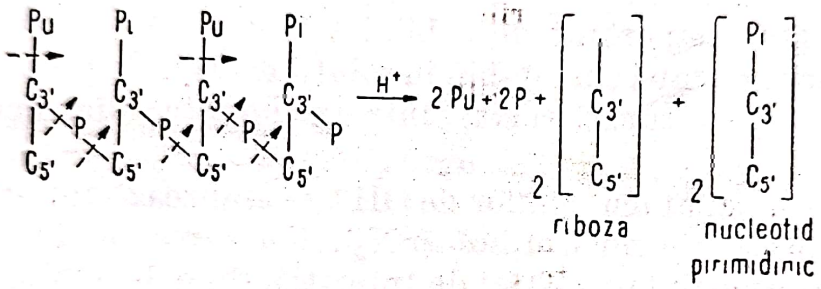


Fig. 49. — Legăturile unui acid ribonucleic, scindate de acizi la locurile indicate de săgeţi şi produşii rezultaţi.

Hidroliza acidă a fost întrebuinţată pentru dozarea cantitativă a tuturor constituenţilor ARN reprezentaţi în schema de mai sus.

Rezistenţa legăturii N-ribozidice a nucleotidelor pirimidinice, faţă de acţiunea acizilor este atît de mare, încît eliberarea bazelor pirimidinice poate fi realizată numai în condiţii energice de hidroliză acidă. În aceste condiţii, unele baze pot suferi modificări, astfel încît dozarea cantitativă a bazelor ARN întîmpină uneori mari dificultăţi. Întrucît hidroliza alcalină a acestor compuşi decurge în condiţii blînde, dozarea bazelor se face de obicei sub formă de mononucleotide.

Există însă unele date în literatură care demonstrează că atît acidul percloric, cît şi acidul formic concentrat eliberează aproape cantitativ toate bazele ARN (Vischer şi Chargaff, 1948; Wyatt, 1951; Marschak şi Vogel, 1951). Bazele purinice şi nucleotidele pirimidinice sînt eliberate cantitativ din ARN în condiţiile unei hidrolize acide medii în timp de aproximativ o oră la temperatura de 100°C. Concentraţia acizilor întrebuinţaţi pentru această scindare este de 1—2 N. ARN din pancreas hidrolizat cu H_2SO_4 2 N la 100°C, pune în libertate azotul purinic după aproximativ 30 de minute de încălzire. Analiza cu ajutorul cromatografiei

pe hîrtie sau prin precipitare cu săruri de argint a arătat că produşii rezultaţi nu au suferit modificări semnificative (Kerr şi colab., 1949).

Smith şi Markham (1950) şi Loring şi colab. (1952) întrebuinţează o concentraţie mai mică de acizi (HCl sau H_2SO_4 1 N) pentru hidroliza ARN extras din drojdie. Randamentul bazelor purinice eliberate după această tehnică a fost de 98—99%, după o oră de hidroliză la 100°C.

După unii autori, determinarea cantităţii de nucleotide pirimidinice prin hidroloiza acidă este afectată de erori dacă nu se ţine seama de hidroliza lor parţială pînă la nucleozide. Totodată, există dovezi că HCl 1 N produce o dezaminare de 3—4% a acidului citidilic (Loring şi colab., 1952).

Nucleotidele pirimidinice obţinute în condiţiile hidrolizei acide s-au dovedit a fi în realitate amestecuri de *2'* şi *3'*-mononucleotide. Din acest punct de vedere există o asemănare între hidroliza acidă şi cea alcalină (Brown şi Todd, 1952).

În comparaţie cu legăturile fosforo-esterice, legăturile N-ribozidice ale nucleotidelor purinice sînt mai slabe faţă de acţiunea acizilor. Astfel, la pH 2, derivaţii acidului adenilic din drojdie, acidul xantilic şi ionzinic îşi desfac legătura N-ribozidică înainte de a se observa eliberarea unei cantităţi apreciabile de fosfor anorganic, după cum rezultă din cercetările lui Levene şi Dmochowski (1931). De altfel, cantitatea de fosfor anorganic pusă în libertate în cursul hidrolizei acide a ARN a fost întrebuinţată de Jones (1916) pentru determinarea cantităţii de nucleotide purinice şi indirect pentru cantitatea de nucleotide pirimidinice acido-rezistente. Eliberarea fosforului anorganic înaintea purinelor a fost observată şi de Kerr şi colab. (1949).

Din rezultatul dozării cantităţii de fosfor labil obţinut în urma hidrolizei cu H_2SO_4 5% la 100°, Jones (1916) a dedus că aproximativ 50% din fosforul ARN din drojdie este legat de nucleotidele purinice, iar restul de nucleotidele pirimidinice. Acest rezultat, coroborat cu alte observaţii, i-a servit lui Levene pentru a emite ipoteza structurii tetranucleotidice a moleculei de ARN.

Tot pentru elucidarea unor probleme de structură a acestui compus au fost întrebuinţate şi soluţiile diluate de acizi. După cum arată Brown şi colab. (1952), soluţia de HCl 0,1 N produce la 23°C în timp de 4 ore hidroliza specifică a legăturii *2',3'*-fosfatice ciclice terminale a lanţului polinucleotidic. Sub acţiunea acestui tratament, legăturile internucleotidice şi N-ribozidice rămîn nealterate (fig. 50). Rezultă polinucleotidul fosforilat în poziţia *3'* (*a*) sau *2'* (*b*) a ribozei nucleotidului terminal. Importanţa acestei reacţii constă în faptul că polinucleotidul nou obţinut, avînd gruparea *2'*-OH sau *3'*-OH liberă, poate fi ulterior oxidat de către periodat, reacţie cu ajutorul căreia se poate cunoaşte natura nucleotidului terminal.

Scanned with OKEN Scanner

Pe de altă parte, tratamentul cu HCl 6 N un timp scurt s-a dovedit a fi potrivit pentru obţinerea dinucleotidelor şi trinucleotidelor acizilor ribonucleici. După Merrifield şi Wolley (1952), ARN din drojdie, tratat

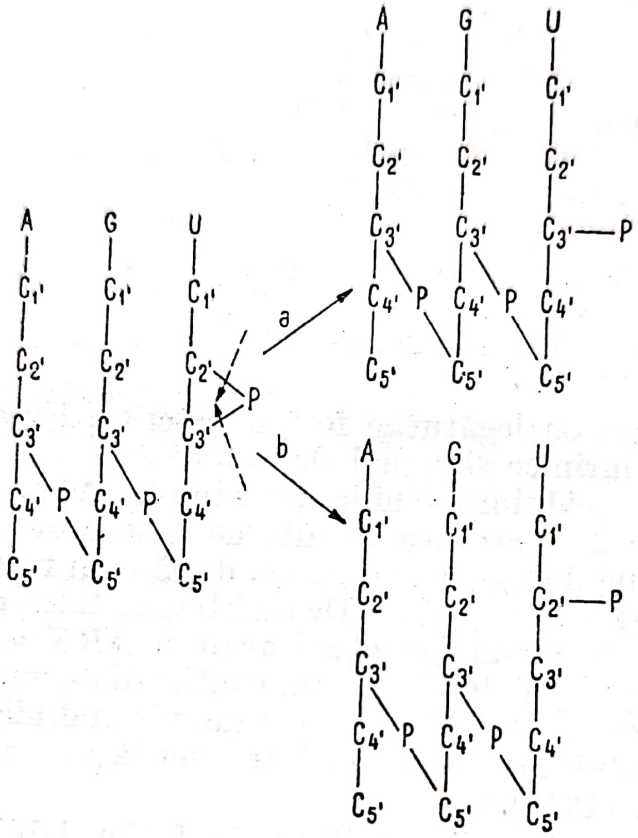


Fig. 50. — Modul de acţiune a HCl 0,1 N asupra unui lanţ polinucleotidic.

timp de 3 min cu HCl 6 N, la temperatura camerei, pune în libertate mai multe dinucleotide şi o trinucleotidă. Acestea au fost fracţionate cu ajutorul unei coloane cromatografice încărcate cu Dowex-*1*-Cl^-.

Mecanismul hidrolizei acide a ARN. După cum s-a arătat, produşii nucleotidici rezultaţi în urma hidrolizei acide a ARN sînt *2′* şi *3′*-mononucleozide, la fel ca şi în cazul hidrolizei alcaline. Pentru a se explica formarea acestor compuşi, s-a admis existenţa unor puncte comune în mersul celor două hidrolize.

În cele ce urmează vom descrie pe scurt numai mecanismul eliberării *2′* şi *3′*-mononucleotidelor din ARN sub influenţa catalitică a ionilor de H, fără să discutăm alte aspecte pe care le poate prezenta hidroliza acidă.

Se disting două etape principale ale hidrolizei acide :

a) prima, în care se formează un produs intermediar cu o structură de *2′,3′*-diester ciclic ;

b) a doua, în care produsul intermediar este transformat de către apă în *2′* şi *3′*-mononucleotide.

a) După cum s-a mai arătat cu ocazia prezentării mecanismului hidrolizei alcaline, în soluţii neutre, legătura *3′,5′*-internucleotidică este stabilă datorită, pe de o parte, disocierii protonului de la gruparea fosforică, şi prin aceasta scade electrofilicitatea generală a fosforului, iar pe de altă parte fiindcă nucleofilicitatea hidroxilului nedisociat din poziţia $C_{2'}$ a ribozei, este scăzută (*I*) (fig. 51).

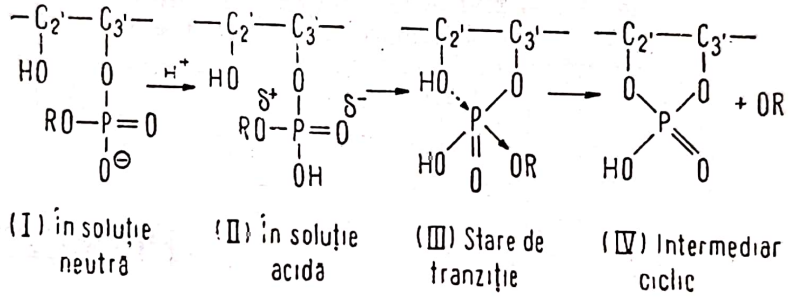


Fig. 51. — Hidroliza acidă. Formarea produşilor intermediari (după Witzel, 1963).

Prin prezenţa ionilor de hidrogen, gruparea PO^- se protonează, polarizîndu-se (*II*). Ca urmare creşte electrofilicitatea fosforului, iar gruparea nucleofilă *2′*-OH poate ataca acum gruparea fosforică. Simultan se produce şi plecarea protonului de la grupa *2′*-OH datorită scăderii electronegativităţii atomului de oxigen. După Witzel (1963), atacul grupei nucleofile *2′*-OH poate avea loc conform mecanismului reacţiei de substituţie nucleofilă de tip 2 (SN_2). Reactivantul nucleofilic (—OH) va ataca prin partea opusă a substituentului care părăseşte molecula. Atacul se va face deci în spatele unuia dintre orbitalii hibrizi Sp^3 ai fosforului, de preferinţă în zona cu cea mai mică densitate de electroni. Or, cele două legături *3′,5′*-diesterice sînt tocmai în această situaţie, deoarece atomii de oxigen liberi angajaţi în rezonanţă sînt încărcaţi negativ. Dintre cele două legături esterice, legătura *3′*-esterică nu poate fi atacată de gruparea *2′*-OH din motive sterice, astfel că singura legătură accesibilă atacului nucleofilic este legătura *5′*-esterică.

Totodată trebuie precizat că reacţiile de substituţie de tip SN_2 se desfăşoară prin intermediul unei stări de tranziţie, care în cazul discutat aici poate avea o configuraţie (*III*). Alte stări de tranziţie sînt greu de admis datorită cauzelor amintite. Starea de tranziţie (*III*) dă naştere intermediarului ciclic (*IV*), ca în figura 51.

b) În continuare, intermediarul *2',3'*-diester ciclic este hidrolizat de către apă. Atacul moleculei de apă poate avea loc într-o egală măsură la legătura *2'* sau *3'* esterică, astfel că produşii reacţiei vor fi *2'* şi *3'*-mononucleotide (fig. 52).

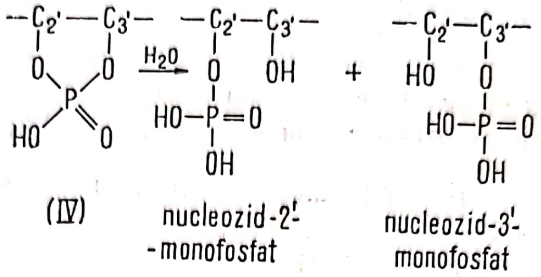


Fig. 52. — Hidroliza compusului intermediar ciclic şi formarea produşilor finali ai reacţiei de hidroliză acidă (după Witzel, 1963).

Hidroliza enzimatică

ENDONUCLEAZE

Ribonucleaza pancreatică. Primele observaţii care au semnalat existenţa unei enzime în extractele pancreatice capabile de a degrada ARN au fost făcute de Jones (1904) şi de Jones şi Perkins (1923). Tot ei au fost primii autori care au remarcat marea stabilitate a acestei enzime faţă de temperatură : extractele pancreatice fierte au fost capabile de a hidroliza ARN din drojdie în produşi acidosolubili, fără ca în acest timp să se pună în libertate baze purinice, pirimidinice sau fosfor anorganic. Faptul că această hidroliză a fost realizată de o enzimă specifică, care persistă sub formă activă chiar şi în extractele pancreatice fierte, a părut surprinzătoare. Cercetările care au urmat au confirmat observaţiile menţionate şi au precizat că enzima prezentă în extractele pancreatice hidrolizează numai o parte din legăturile internucleotidice ale ARN (Schmidt şi Levene, 1938). Termenul de „ribonuclează" a fost introdus de Dubos şi Thomson (1938), care au reuşit o purificare avansată a enzimei din extractele pancreatice.

Doi ani mai tîrziu, Kunitz (1940) pune la punct metoda de cristalizare a RN-azei pancreatice în urma unor fracţionări efectuate cu sulfat de amoniu. Chiar după mai multe recristalizări, produsul a conţinut totuşi urme de enzime proteolitice.

Cu această ocazie s-au stabilit unele proprietăţi ale RN-azei cristalizate, printre care pH-ul optim, situat în jurul valorii de 7,7. La pH 5,

activitatea maximă a enzimei este la 65°C. Marea stabilitate a RN-azei faţă de temperatură face ca activitatea ei să scadă numai cu 20% cînd este încălzită 30 min la 100° şi la un pH cuprins între 2 şi 5.

Întrucît ARN suferă unele degradări spontane dacă este lăsat mai mult timp la pH 7,7, se recomandă ca reacţia cu RN-ază să se facă la un pH slab acid (între 5 şi 6), domeniu în care activitatea ei este suficient de mare.

La temperatura camerei sau chiar la temperaturi mai scăzute, RN-aza prezintă o activitate considerabilă. Datorită acestei proprietăţi, proba cu RN-ază se efectuează în majoritatea cazurilor la 22°C.

Unele proprietăţi ale RN-azei pancreatice. Greutatea moleculară a RN-azei pancreatice este de aproximativ 14 000. Prin metoda de măsurare a presiunii osmotice, Kunitz (1940) a obţinut valoarea de 15 000 ±1 000, în timp ce pe baza analizei acizilor aminaţi Hirs şi colab. (1953) şi Hirs (1954) au găsit valoarea de 14 100.

Primele cercetări consacrate stabilirii structurii RN-azei au arătat că molecula ei este constituită dintr-un singur lanţ peptidic, pliat în 5 segmente. La această concluzie au condus rezultatele determinării acizilor aminaţi terminali şi analizele difracţiei cu ajutorul razelor X. Primele au arătat că RN-aza conţine doi acizi aminaţi terminali : valina şi lizina, iar metoda difracţiei razelor X a arătat că molecula posedă 5 lanţuri cristalografice.

Recent, Smith şi colab. (1963) au stabilit secvenţa tuturor celor 124 de acizi aminaţi ai RN-azei pancreatice. Astfel, această enzimă este una dintre puţinele proteine a căror structură primară este cunoscută (fig. 53).

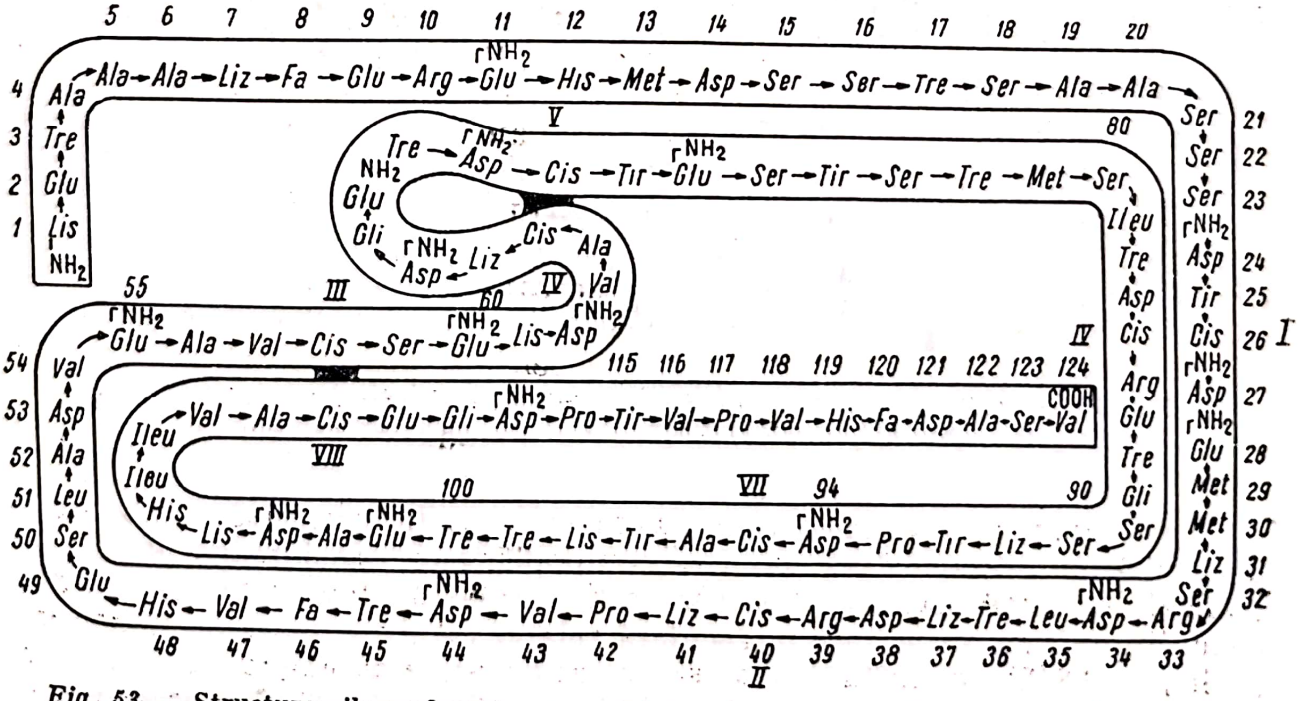


Fig. 53. — Structura ribonucleazei pancreatice cu secvenţa acizilor aminaţi în interiorul moleculei (după Smith şi colab., 1963).

Activitatea RN-azei pancreatice este suprimată în două etape de acţiunea pepsinei. Prima etapă a digestiei cu pepsină, care de altfel decurge lent, determină scăderea activităţii RN-azei cu 65%, fără ca în acest timp să se observe apariţia unor grupe terminale noi. În schimb, etapa a doua decurge rapid, iar scindarea RN-azei este însoţită de pierderea totală a activităţii sale.

Dintre inhibitorii activităţii RN-azei se pot aminti : heparina (Zöllner şi Felling, 1953), penicilina (Massart şi colab., 1947), dodecil-sulfatul de sodiu, clorhidratul de guanidină, fenolul, la care în ultimul timp s-au adăugat bentonita şi polivinil-sulfatul.

Specificitatea. Încă de la primele lucrări consacrate cunoaşterii mecanismului de acţiune al RN-azei pancreatice s-a remarcat că această enzimă nu produce hidroliza totală a ARN. Bacher şi Allen (1950) au arătat că fragmentele nedializabile rezultate sînt bogate în purine; alţi autori constată că între produşii de reacţie se pot pune în evidenţă mononucleotide pirimidinice, în schimb prezenţa nucleotidelor purinice nu a fost semnalată (Schmidt şi colab., 1951, Magasanik şi Chargaff, 1951).

Hidroliza alcalină a produşilor obţinuţi în urma tratării ARN cu RN-ază şi fosfomonoesterază a permis să se stabilească faptul că RN-aza a scindat compusul pînă la un amestec de mononucleotide pirimidinice şi oligonucleotide purinice, a căror componenţă terminală este un nucleozid-*2′* sau *3′*-fosfat-pirimidinic (Schmidt şi colab., 1951).

Aceste rezultate au permis să se ajungă la concluzia după care RN-aza pancreatică nu catalizează toate legăturile internucleotidice, ci numai pe acelea dintre grupările *3′*-fosforice ale unui nucleotid pirimidinic şi grupările *5′*-hidroxi ale nucleotidului purinic sau pirimidinic adiacent (fig. 54).

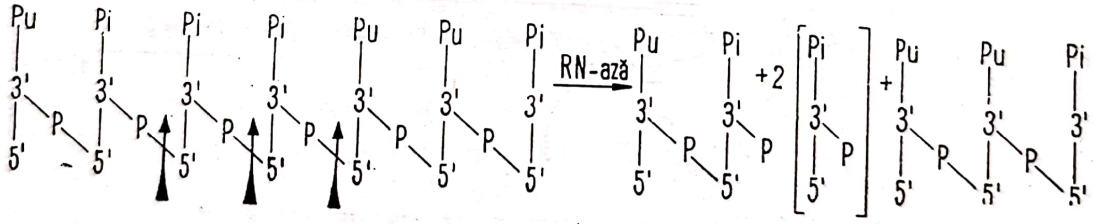


Fig. 54. — Legăturile internucleotidice hidrolizate de ribonucleaza pancreatică. *Pu* reprezintă o bază purinică, iar *Pi* o bază pirimidinică.

Cercetările ulterioare au confirmat această concluzie. O atenţie deosebită a fost acordată analizei componentelor considerate iniţial nedializabile. După Zamenhof şi Chargaff (1949), ele reprezintă „acizi nucleici limită" cu o greutate moleculară relativ ridicată. Ulterior, Markham şi Smith (1952) au arătat că aceste componente sînt oligonucleotide, iar difuzarea lor prin membranele de dializă este împiedicată de concentraţia ridicată a ionilor de NaCl din soluţie.

Fracţionarea oligonucleotidelor rezultate în urma hidrolizei cu RN-ază fie cu ajutorul cromatografiei pe coloană (Volkin şi Cohn, 1953), fie prin cromatografia sau electroforeza pe hîrtie (Markham şi Smith, 1952) a permis cunoaşterea compoziţiei şi proprietăţilor lor.

Tratamentul de scurtă durată efectuat cu RN-ază asupra ARN a pus în evidenţă apariţia în cursul reacţiei de hidroliză a unor produşi intermediari şi obţinerea unor informaţii asupra mecanismului reacţiei enzimatice.

În aceste condiţii experimentale s-a observat prezenţa a *2′,-3′*-fosfaţilor ciclici, a nucleozidelor pirimidinice şi a oligonucleotidelor cu fosfaţi ciclici terminali. Ulterior, aceşti produşi sînt transformaţi de RN-ază în *3′*-fosfaţii corespunzători. Aceste constatări au permis autorilor să afirme că hidroliza decurge în două etape : în prima are loc formarea derivaţilor *2′,3′*-ciclici amintiţi, printr-un mecanism de transfosforilare, care — în etapa a doua — sînt convertiţi în *3′*-fosfaţii respectivi.

Acest punct de vedere a fost sprijinit de cercetările efectuate asupra unor compuşi ciclici sintetici. Astfel, *2′,3′*-fosfatul ciclic al uridinei şi *2′,3′*-fosfatul ciclic al citidinei, trataţi cu RN-ază pancreatică dau întotdeauna nucleozid-*2′*-fosfaţi prin scindarea exclusivă a legăturii esterice $C_{2'}$-O-P. Este interesant de arătat că *2′,3′*-fosfaţii ciclici ai adenozinei sau guanozinei nu sînt hidrolizaţi de RN-aza pancreatică.

Aceste rezultate au demonstrat în mod indirect dependenţa activităţii enzimei faţă de componenta pirimidinică din lanţul moleculei de ARN (Brown şi colab., 1952).

Poliribonucleotidele sintetice tratate cu RN-ază pancreatică au oferit noi informaţii asupra specificităţii mecanismului de acţiune a enzimei.

Hidroliza exhaustivă a unui polimer sintetic, compus din adenozină şi uridină (poli-AU), cu RN-ază pancreatică a dat naştere unui nucleozid-*3′*-fosfat (*3′*-UMP) şi la o serie de dinucleotide care au conţinut un acid uridilic esterificat la $C_{3'}$ al ribozei, alături de 1, 2, 3 sau 4 acizi adenilici. Tratamentul scurt cu RN-ază a condus la formarea unor compuşi ciclici, *2′,3′*-fosfat de uridină, oligonucleotide ce conţin uridina ciclică terminală şi produşi polinucleotidici cu nucleotid terminal ciclic (Heppel şi colab., 1957 *a*).

Rezultate similare au fost obţinute şi cu ocazia hidrolizei unui polimer sintetic, care a fost constituit din adenozină, guanozină, uridină şi citidină (poli-AGUC), cu RN-aza pancreatică. Produşii de reacţie au fost nucleozid-*3′*-fosfaţi ai uridinei şi citidinei, alături de un amestec de polinucleotide. Şi în acest caz s-a putut pune în evidenţă prezenţa compuşilor ciclici ai pirimidinelor în urma tratamentului de scurtă durată cu RN-ază (Heppel şi colab., 1957 *b*).

Datele experimentale obţinute cu ajutorul polinucleotidelor sintetice au avut meritul de a confirma observaţiile anterioare privind mecanismul de acţiune a RN-azei pancreatice asupra ARN naturali. Pe de

Scanned with OKEN Scanner

altă parte, s-a reuşit să se demonstreze de asemenea că natura legăturilor (şi a compuşilor) din cele două clase de polimeri este aceeaşi.

Într-o serie de lucrări consacrate studiului secvenţei nucleotidelor din ARN, Staehelin (1961 *a*, *b*, *c*) a analizat, cu ajutorul cromatografiei pe coloană de DEAE-celuloză, produşii de reacţie rezultaţi în urma hidrolizei unor ARN cu RN-aza pancreatică. ARN înalt polimerizat, extras din drojdie, a dat naştere la următoarea serie de mono-, di- şi trinucleotide, ca şi unor compuşi cu un grad de polimerizare mai înalt* :

Cp	ApCp	ApApCp	ApApApCp etc.
Up	ApUp	ApApUp	
	GpCp	GpApCp	
	CpUp	ApCpCp	
		GpApUp	
		ApGpUp	
		GpGpCp	
		GpGpUp	

Separarea cromatografică a acestor compuşi este arătată în figura 55. Rezultă şi de aci că RN-aza scindează specific numai legăturile internucleotidice adiacente la *3'*-fosfaţii citidinei şi uridinei, în timp ce legăturile similare adiacente nucleozidelor purinice rămîn neafectate.

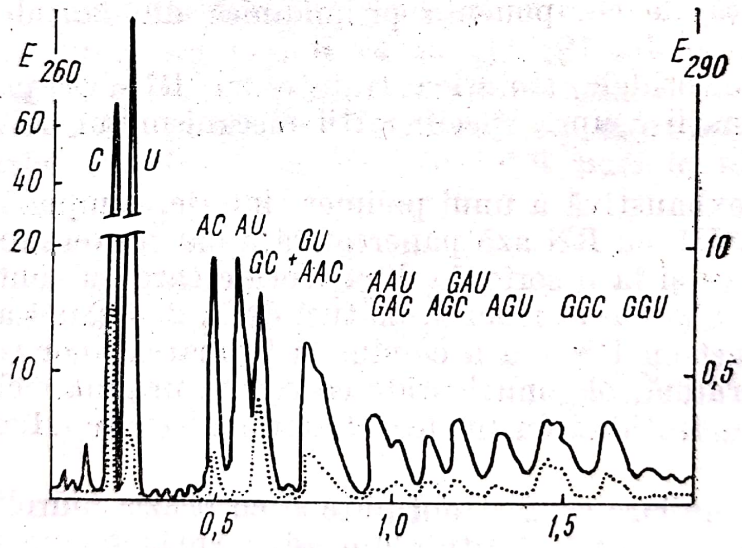


Fig. 55. — Cromatografia pe coloană de DEAE-celuloză a produşilor rezultaţi în urma hidrolizei cu RN-ază pancreatică a ARN înalt polimerizat din drojdie. Linia continuă reprezintă valoarea extincţiei la 260 mμ, iar linia întreruptă pe aceea la 290 mμ.

* Pentru notaţia nucleotidelor şi dinucleotidelor s-a întrebuinţat sistemul propus de Markham şi Smith (1952) şi Heppel şi colab. (1957 *a*) : *p* aflat în stînga literei ce simbolizează nucleozidul arată că gruparea fosforică a esterificat poziţia $C_{5'}$ a ribozei, în timp ce *p* aşezat în dreapta arată că gruparea fosfatică a esterificat $C_{3'}$ a ribozei.

Același autor a studiat și cantitatea de mono-, di- și trinucleotide rezultate în urma hidrolizei mai multor ARN cu ribonucleaza pancreatică. S-a constatat că, la toți acizii nucleici analizați, cantitatea acestor produși nu corespunde cu aceea care ar fi trebuit să rezulte dintr-o structură polinucleotidică în care nucleotidele ar fi distribuite la întîmplare. De aici s-a ajuns la concluzia că, în interiorul ARN, nucleotidele sînt aranjate într-o ordine specifică.

Mecanismul de acțiune a RN-azei pancreatice. Scindarea legăturii *3′,5′*-internucleotidice cu ajutorul RN-azei pancreatice are loc în două etape : în prima are loc formarea unui diester ciclic, iar în a doua hidroliza specifică a acestuia. Prin urmare, RN-aza nu produce numai o hidroliză simplă, ci o transfosforilare intramoleculară urmată de o hidroliză.

Cele două etape menționate se întîlnesc și în cazul hidrolizei neenzimatice. Dar, spre deosebire de aceasta, în care produșii de reacție sînt formați dintr-un amestec de *2′* și *3′*-mononucleotide, hidroliza enzimatică cu RN-ază conduce în mod exclusiv la formarea *3′*-mononucleotidelor. Există deci motive să se admită că pînă la formarea intermediarului ciclic calea de reacție este identică în ambele cazuri. În continuare însă, cele două hidrolize se diferențiază : în timpul hidrolizei neenzimatice, intermediarul ciclic este hidrolizat în egală măsură la legătura *2′* sau *3′*-esterică, pe cînd ribonucleaza determină activarea specifică numai a legăturii *2′*-esterice a intermediarului, pe care apoi o scindează.

Pe de altă parte, s-a remarcat faptul că produșii de reacție rezultați în urma hidrolizei ARN cu RN-ază pancreatică sînt *3′*-mononucleotide pirimidinice libere și oligonucleotide ce conțin ca nucleotid terminal un nucleozid-*2′* sau *3′*-fosfat-pirimidinic. Aceste observații au atras atenția asupra rolului important pe care îl are prezența ciclului pirimidinic în reacția de hidroliză enzimatică.

Influența bazelor azotate asupra vitezei de reacție. Primele observații, făcute de Magasanik și Chargaff (1951) și apoi de Dimroth și colab. (1959), au demonstrat că în timpul hidrolizei ARN se formează mai repede mononucleotidele pirimidinice decît cele purinice. Witzel (1960), urmărind hidroliza unor dinucleozid-difosfați la diferite pH-uri, a remarcat că, indiferent de pH, viteza de reacție depinde de natura bazei azotate din nucleozidul legat în poziția *3′*.

Din aceste prime rezultate s-a dedus că bazele azotate influențează viteza reacției de hidroliză a ARN. La fel ca în hidroliza neenzimatică, și în cazul hidrolizei enzimatice a ARN, pentru ca legăturile *3′,5′*-internucleotidice să poată fi scindate, ele trebuie să sufere o activare. Din motive sterice, este greu de admis că bazele azotate pot influența electrofilicitatea fosforului. În schimb este ușor de presupus că acestea au o puternică influență asupra nucleofilicității grupei *2′*-OH a ribozei din nucleozidul comun.

Scanned with OKEN Scanner

Într-adevăr, purinele (I) avînd azot în poziţia *3'* şi pirimidinele (*II*) cu oxigen la C_2, pot mări nucleofilia grupării *2'*-OH a ribozei prin intermediul unor legături de hidrogen (Witzel, 1963) (fig. 56).

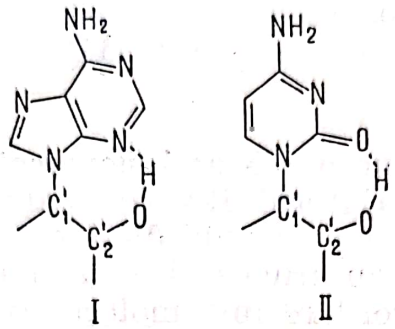


Fig. 56.—Legătura de hidrogen care se formează între o bază purinică şi riboza adiacentă (*I*) şi aceeaşi legătură în cazul ciclului pirimidinic (*II*).

Astăzi avem suficiente argumente pentru a considera că legăturile de hidrogen formate de bazele purinice, prin mecanismul arătat în formula *I*, sînt mai slabe decît cele corespunzătoare ale bazelor pirimidinice din formula *II*. Acestea se bazează atît pe faptul că nucleofilia atomului N_3, purinic este mai scăzută decît a atomului de oxigen C_2, al pirimidinei, cît şi pe observaţia că distanţa dintre N_3, purinic şi protonul grupării *2'*-OH a ribozei adiacente este mai mare comparativ cu aceea dintre oxigenul de la C_2, pirimidinic şi gruparea *2'*-OH a ribozei.

Din formulele structurale *I* şi *II* (fig. 56) rezultă că grupele acceptoare de proton N_3, şi oxigenul de la C_2, nu sînt izosterice faţă de legătura ribozilică. N_3, se găseşte într-un ciclu ataşat de un al doilea ciclu de 5 atomi, ceea ce determină ca unghiul α să fie diferit de unghiul corespunzător α' din ciclul în care se găseşte de la C_2, pirimidinic. Acesta din urmă este ataşat numai de un ciclu de 6 atomi. Unghiul α fiind mai mare, distanţa dintre N_3, şi gruparea *2'*-OH se măreşte, iar proporţional cu acesta reduce rezistenţa legăturii de hidrogen.

Dacă bazele azotate acţionează în timpul reacţiei de hidroliză a legăturii internucleotidice prin acest mecanism, ar trebui ca viteza de reacţie să depindă de rezistenţa legăturilor de hidrogen ce se pot forma între diferitele baze azotate şi gruparea *2'*-OH.

În cazul a două serii de produşi de tipul YpA şi YpC, în care Y este una din bazele A, G, C sau U, s-a găsit că ordinea de cataliză variază cu starea de protonare a substituenţilor:

la pH 12,2	U > C > G > A
la pH 7	C > U ⩾ A > G
la pH 1	U > C > A > G

Aceste rezultate au putut aduce dovada că rezistența legăturilor de hidrogen dintre bazele pirimidinice și gruparea 2′-OH este mai puternică decît cele corespunzătoare ale bazelor purinice. Totodată s-a observat că, în clasa pirimidinelor, substituenții de la C_4 accelerează viteza de reacție în ordinea: $O^- > NH_2 > OH > NH_3^+$.

Această regularitate demonstrează că rezistența legăturilor de hidrogen amintite la pirimidine depinde de bazicitatea oxigenului de la $C_{2'}$.

Datele prezentate aduc argumente evidente în favoarea influenței structurii bazelor azotate asupra vitezei reacției de hidroliză. Cu ajutorul lor s-a demonstrat de ce pirimidinele activează mai puternic decît purinele gruparea 2′-OH a ribozei, care participă apoi printr-un atac nucleofilic la scindarea legăturii 3′,5′-internucleotidice.

Etapele hidrolizei. Înainte de a descrie cele două etape ale hidrolizei enzimatice a legăturii 3′,5′-internucleotidice trebuie menționat faptul că protonarea enzimatică este mai slabă decît aceea realizată de ionii H_3O^+ în timpul hidrolizei neenzimatice. Din această cauză, polarizarea fosforului este mai slabă, iar hidroliza are loc numai acolo unde legătura internucleotidică este mai puternic activată de bazele azotate adiacente. Or, tocmai acesta este cazul legăturilor ce au nucleozide pirimidinice în poziția 3′. Rezultă de aici un fapt deosebit de important, și anume că hidroliza enzimatică specifică a legăturilor 3′,5′-internucleotidice ale ARN se datorește atît RN-azei, cît și bazei pirimidinice.

a) În prima etapă, RN-aza pancreatică protonează gruparea PO⁻ (*I*) (fig. 57). Prin aceasta, electrofilicitatea fosforului crește. Simultan are loc atacul grupării 2′-OH, nucleofil activat de către ciclul pirimidinic vecin, asupra spatelui legăturii esterice cu densitatea de electroni cea mai scăzută. Drept consecință, prin intermediul unei stări de tranziție (*II*), are loc formarea intermediarului ciclic (*III*). În această etapă, baza pirimidinică participă atît la creșterea nucleofilicității grupei 2′-OH, cît și la transferul protonului acestei grupări în momentul ruperii legăturii 5′-esterice. Gruparea R-OH rezultată este reținută de baza pirimidinică cu ajutorul unei legături de hidrogen.

Prin schimbul reversibil al grupei R-OH cu o moleculă de apă, intermediarul ciclic (*III*) se găsește în echilibru cu intermediarul (*IV*), compus care poate fi izolat dacă RN-aza acționează numai un timp scurt și în cantitate mică asupra ARN.

b) Etapa a doua a reacției se caracterizează tot prin acțiunea comună a bazei pirimidinice și a ribonucleazei. De data aceasta substratul comun asupra căruia acționează enzima și ciclul pirimidinic este legătura 2′ esterică a intermediarului ciclic (*IV*). Molecula de apă activată de pirimidină atacă nucleofilic gruparea fosforică, iar protonul moleculei de apă este transferat la oxigenul de la $C_{2'}$. Starea de tranziție (*V*) explică foarte bine mecanismul prin care se formează produsul final, 3′-mononucleotidul (*VI*). Cele două etape specifice ale hidrolizei legăturii 3′,5′-in-

ternucleotidice prin intermediul RN-azei pancreatice pot fi reprezentate schematic prin formulele structurale prezentate în figura 57.

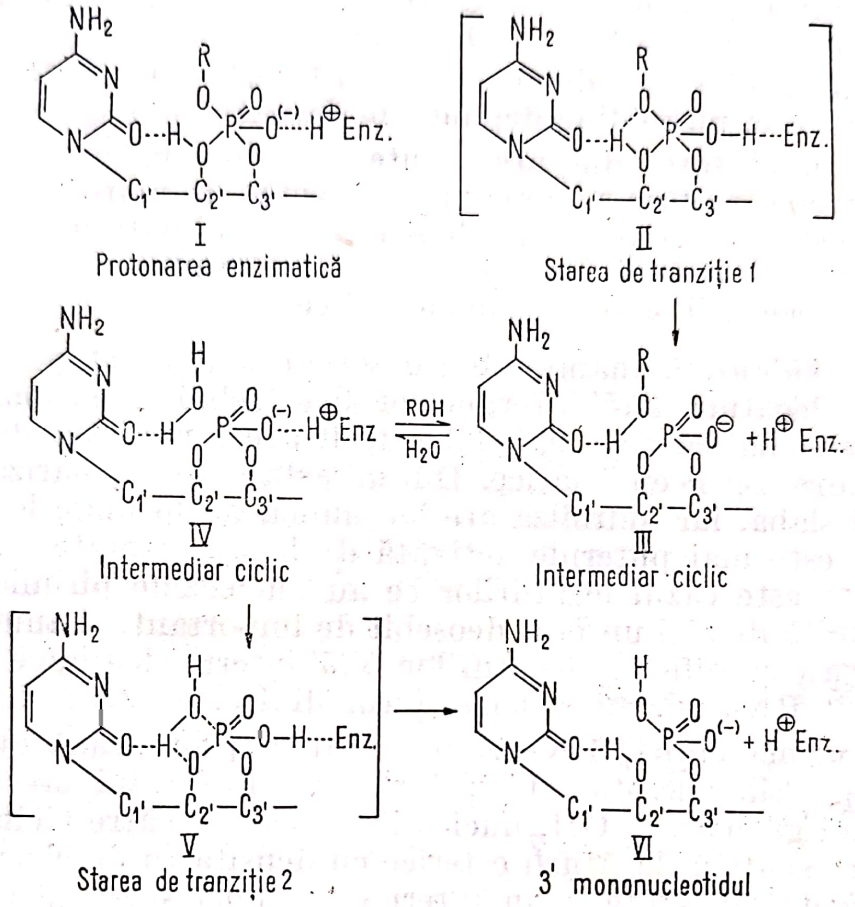


Fig. 57. — Mecanismul hidrolizei legăturii *3'-5'*-internucleotidice produsă de RN-aza pancreatică (după Witzel și colab., 1963).

Alte ribonucleaze. În afară de RN-aza pancreatică, se cunosc astăzi și alte ribonucleaze, cu proprietăți diferite de ale acesteia. Ele au fost izolate din variate surse biologice de origine animală, vegetală și microbiană. Mecanismul lor de acțiune asupra legăturii internucleotidice a ARN este deosebit de acela al RN-azei pancreatice. S-a putut pune în evidență faptul că acestea acționează asupra ARN printr-un mecanism specific de hidroliză.

Numărul RN-azelor noi, descoperite în ultimii ani, este în continuă creștere, astfel că posibilitățile de hidroliză specifică a ARN devin din ce în ce mai variate. Ele dau posibilitatea de a cunoaște natura legăturilor internucleotidice, compoziția și secvența nucleotidelor din molecula de ARN. Este interesant de constatat că uneori din aceeași sursă biologică s-au izolat RN-aze cu proprietăți total diferite.

Scanned with OKEN Scanner

Ribonucleaze izolate din surse animale. Tot în extractele de pancreas, Schmidt şi colab. (1950) au pus în evidenţă o enzimă care scindează legăturile internucleotidice rezistente la acţiunea RN-azei pancreatice cristalizate, descrisă anterior. Spre deosebire de prima, această RN-ază este labilă faţă de acţiunea temperaturii şi are proprietatea de a hidroliza legăturile esterice ale *3'*-nucleotidelor purinice.

În extractele de splină s-a descoperit o ribonuclează labilă faţă de căldură cu activitatea optimă la pH 5,2 în prezenţa ionilor de Mg (Maver şi Greco, 1949). Enzima are proprietatea de a hidroliza legătura *3',5'*-internucleotidică şi dă naştere exclusiv la *3'*-mononucleotide (Heppel şi colab., 1957 *a* şi *b*).

Din ficat s-a izolat o RN-ază capabilă de a elibera din ARN nucleotidele pirimidinice ciclice fără a le hidroliza în continuare (Zytko şi colab. 1958). În acelaşi ţesut, Heppel şi colab. (1956) descriu o RN-ază ce eliberează oligonucleotid-*5'*-fosfaţi din molecula de ARN.

Ribonucleaze izolate din plante. RN-azele izolate din frunzele de mazăre de Holden şi Pirie (1955) şi din frunzele de tutun de Frisch-Niggemeyer şi Reddi (1957) hidrolizează toate legăturile internucleotidice *3',5'*-diesterice. Din fosfaţii *2',3'*-ciclici rezultaţi, numai cei ai bazelor purinice sînt hidrolizaţi mai departe pînă la *3'*-mononucleotide.

Din spanac, Tuve şi Anfinsen (1960) au izolat o RN-ază care scindează toate legăturile diesterice în ordinea G, A, U, C.

În acest caz, mononucleotidele ciclice rezultate sînt hidrolizate pînă la *3'*-monoesterii respectivi.

Ribonucleaze din surse microbiene. În extractele de *E. coli* s-au putut pune în evidenţă două RN-aze diferite. Una dintre ele se găseşte sub formă latentă, ataşată de ribozomii 30 *S*. O dată desprinsă de ribozomi, ea hidrolizează ARN pînă la *3'*-mononucleotide. Produşii intermediari ai hidrolizei s-au dovedit a fi fosfaţi *2',3'*-ciclici. Această enzimă a fost denumită *RN-aza I* (Elson, 1959; Spahr şi Hollingworth, 1961).

A doua RN-ază, descrisă mai întîi de Wade (1961), scindează ARN printr-un alt mecanism pînă la nucleozid-*5'*-fosfaţi şi un reziduu format din oligonucleotide. Activitatea ei depinde de prezenţa ionilor de K^+ (sau NH_4^+) şi Mg^{++} (sau Mn^{++}), fapt ce o deosebeşte atît de RN-aza I, cît şi de polinucleotid-fosforilaza existentă în acelaşi sistem. Ea acţionează asupra moleculei de ARN atît ca o endonuclează, cît şi ca o exonuclează. Această nouă enzimă a primit denumirea de *RN-aza II* (Spahr şi Schlesinger, 1963; Spahr, 1964).

Din *Bacillus subtilis* s-a putut izola şi studia o RN-ază ce hidrolizează legăturile *3',5'*-diesterice ale polinucleotidelor. Viteza de reacţie scade în ordinea: poli-G > poli-I > poli-A > poli-U şi poli-C, cu un factor cuprins între 10 şi 100. În prima etapă se formează oligonucleotide cu un diester *2',3'*-ciclic terminal, iar în a doua se formează numai acizii

3'-guanilici şi inozinici, alături de fosfaţii ciclici ai celorlalte nucleotide (Nishimura, 1960).

Din takadiastaze (culturi de *Aspergillus orizae*) s-au purificat două RN-aze, denumite T_1 şi T_2.

Prima are proprietatea de a rupe legăturile guanozin-*3'*-fosfat → nucleozide (Sato şi Egami, 1957), dar nu şi legătura guanozină metilată-*3'*-fosfat → nucleotid (McCully şi Cantoni, 1961). Produsele de reacţie sînt guanozin-*3'*-fosfaţi sau oligonucleotide care se termină cu un reziduu guanilic. În prima etapă a reacţiei se formează acid guanilic *2',3'*-ciclic, care apoi este hidrolizat în *3'*-monoester. Importanţa acestei enzime pentru studiul secvenţei nucleotidelor din interiorul lanţului macromolecular a crescut considerabil o dată cu descoperirea făcută de Holley şi colab. (1965), care a demonstrat că molecula de ARN poate fi scindată selectiv în diferite puncte prin tratarea ei la 0° şi un anumit timp cu ribonucleaza T_1. De altfel, această proprietate a permis autorilor citaţi să stabilească pentru un ARN-*S* secvenţa completă a tuturor nucleotidelor.

A doua enzimă scindează numai legăturile adenozin-*3'*-fosfatice pînă la nucleotide, pentru a pune în libertate adenozin-*3'*-fosfaţi şi oligonucleotide care se termină cu un reziduu adenilic. Nu este cunoscut încă dacă în cursul hidrolizei se formează întîi diesterii *2',3'*-ciclici ca produşi intermediari (Noai-Tada şi colab., 1959).

EXONUCLEAZE

Fosfodiesteraza specifică pentru eliberarea nucleozid-5'-fosfaţilor. Prezenţa fosfodiesterazei în veninul de şarpe a fost pusă în evidenţă pentru prima dată de Uzawa (1932); mai tîrziu, Gulland şi Jackson (1938) şi Cohn şi Volkin (1953) au arătat că produşii de hidroliză ai fosfodiesterazei sînt nucleozid-*5'*-fosfaţi.

Enzima hidrolizează lanţul ribonucleotidic începînd de la capătul care are un hidroxil liber în poziţia *3'*. Desfacerea succesivă a nucleozid-*5'*-fosfaţilor se face progresiv, indiferent de natura lor purinică sau pirimidinică (fig. 58).

Prin urmare, primul nucleozid-*5'*-fosfat eliberat este al citozinei, apoi al guaninei, uracilului şi aşa mai departe.

Un dezavantaj al folosirii acestei enzime este faptul că reacţia nu poate fi oprită decît cu mari dificultăţi într-un anumit punct al secvenţei nucleotidelor. Prezenţa unei grupări *5'*-fosforice accelerează reacţia în timp, aceea a uneia *3'*-fosforice o micşorează (Privat de Garilhe şi Laskowski, 1956).

S-au izolat şi alte fosfodiesteraze care acţionează specific asupra legăturilor fosfodiesterice. Astfel, Anderson şi Heppel (1961) au extras din sîngele bolnavilor de leucemie o fosfodiesterază care eliberează monio-nucleozid-*5'*-fosfaţii din molecula de ARN. Ea nu hidrolizează însă esterii

simpli ai nucleozid-5′-fosfaţilor. Pentru activarea enzimei este deci necesară existenţa grupelor nucleozidice legate de ambele părţi ale legăturii fosfodiesterice.

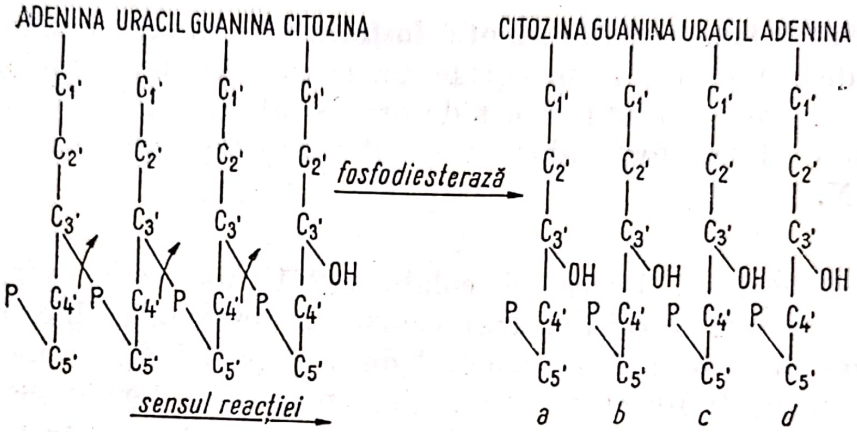


Fig. 58. — Legăturile internucleotidice scindate de fosfodiesteraza din veninul de şarpe. Produşii de reacţie sînt nucleozid-5′-fosfaţi.

Fosfodiesteraza specifică pentru eliberarea nucleozid-3′-fosfaţilor. În această categorie intră enzimele care atacă lanţul ribo- şi dezoxiribonucleic începînd de la capătul care are o grupă OH liberă în poziţia 5′, eliberînd succesiv nucleozid-3′-fosfaţii (fig. 59).

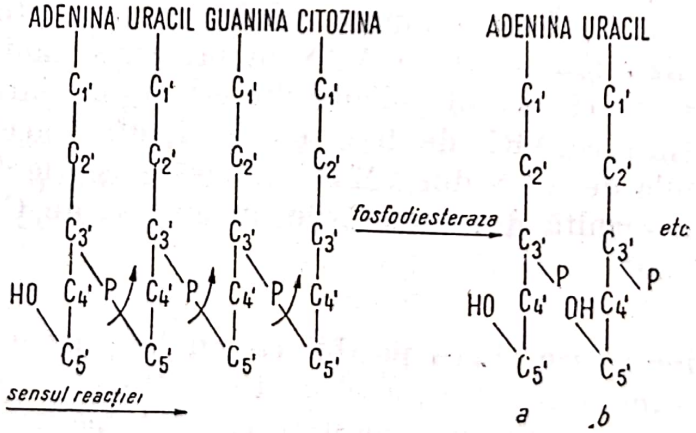


Fig. 59. — Fosfodiesteraza din splină scindează lanţul polinucleotidic începînd de la capătul moleculei cu o grupare OH liberă în poziţia 5′. Produşii de reacţie sînt nucleozid-3′-fosfaţi.

O fosfodiesterază înzestrată cu o specificitate similară a fost izolată de Razzel şi Khorana (1961) din splină. După un mecanism asemănător acţionează şi enzima izolată din muşchii peştilor de Tomlison (1958).

Acizii ribonucleici sînt hidrolizaţi de această enzimă începînd de la capătul lor care conţine o grupare OH liberă în poziţia $C_{5'}$. Produşii reacţiei sînt nucleozid-*3'*-fosfaţi.

Pirofosforilaza şi polinucleotid-fosforilaza. Ambele enzime au proprietatea de a încorpora nucleotide noi la capetele moleculelor de ARN. Totodată, în prezenţa unui exces de ortofosfat în cazul polinucleotid-fosforilazei sau al pirofosfatului în cazul pirofosforilazei, acestea hidrolizează ARN.

Pirofosforilaza. Preiss şi colab. (1961) au supus pirofosforilazei ARN-*S* extras din *E. coli*, cu care ocazie au observat că hidroliza are loc numai pînă la al patrulea nucleotid de la capăt. Prin urmare, în aceste condiţii s-au pus în libertate ultimele trei nucleotide terminale ale ARN-*S*. Întrucît pirofosforilaza este capabilă şi de reacţia de încorporare a nucleotidelor terminale, ARN-*S* degradat a putut fi resintetizat cu ajutorul ei.

Prin introducerea în sistemul de reacţie a unor nucleotide marcate, s-a reuşit cu mai multă uşurinţă să se studieze natura secvenţei nucleotidelor terminale.

Polinucleotid-fosforilaza. Mecanismul de acţiune al acestei enzime va fi amplu discutat în capitolul ce se ocupă de biosinteza ARN. Pentru moment ţinem să subliniem numai proprietatea acestei enzime de a produce fosforoliza moleculei de ARN în prezenţa unui exces de ortofosfat. S-a observat că acidul poliadenilic este uşor hidrolizat şi într-un timp scurt, în timp ce ARN de diverse origini suferă acelaşi proces mult mai lent. Molecula de ARN din VMT face însă excepţie de la această regulă, după cum rezultă din cercetările întreprinse de Grunberg-Manago şi colab. (1955).

Fosfomonoesteraze. Este posibil ca un lanţ ribonucleotidic să se termine (sau să înceapă) cu un nucleozid esterificat cu o grupare fosforică în poziţia *3'* sau *5'*. Fosfomonoesterazele sînt specifice pentru eliberarea acestei grupări fosforice, fără a desface vreo legătură internucleotidică (fig. 60).

S-au izolat numeroase fosfomonoesteraze, dintre care amintim:

a) fosfomonoesteraza din veninul de şarpe (Heppel şi Hilmoe, 1955) hidrolizează nucleozid-*5'*-fosfaţii;

b) fosfomonoesteraza din cartofi (Heppel şi Hilmoe, 1955) hidrolizează nucleozid-*3'* şi *5'*-fosfaţii, de preferinţă însă *5'*-fosfaţii;

c) fosfomonoesteraza prostatică (Markham şi Smith, 1952) hidrolizează nucleozid *3'*,*5'*-fosfaţii;

d) fosfomonoesteraza din „secară" (Cunningham, 1958) hidrolizează numai nucleozid *3'*-fosfaţii.

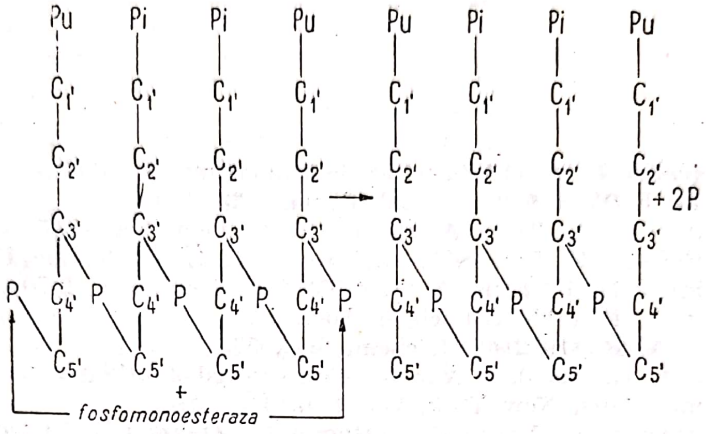


Fig. 60. — Fosfomonoesteraza eliberează grupările fosforice terminale ale lanţului polinucleotidic.

EXO- ŞI ENDONUCLEAZE

Fosfodiesteraza din *Micrococus pyogenes*. Existenţa unei nucleaze în mediul de cultură al *Micrococus pyogenes*, varietatea *aureus*, cu un mecanism de acţiune particular, a fost descrisă pentru prima dată de Cunningham şi colab. (1956). Din acest mediu au purificat parţial o enzimă şi au studiat acţiunea ei asupra ADN. În produşii de hidroliză au găsit prezenţa mononucleotid-*3'*-fosfaţilor şi a oligonucleotidelor. Doi ani mai tîrziu, Cunningham (1958) a arătat că această enzimă, dacă este activată de ionii de calciu, poate hidroliza şi ARN.

Modul de acţiune al fosfodiesterazei asupra ARN a fost studiat de Reddi (1959, 1960). În hidrolizatul obţinut, el a identificat următorii mono- şi dinucleotizi: adenozin-, guanozin-, citidin- şi uridin-*3'*-fosfaţi; adenilil-*3'*,*5'* şi citidin-*3'*-fosfaţi; adenilil-*3'*,*5'* şi guanozin-*3'*-fosfaţi; uridilil-*3'*,*5'* şi guanozin-*3'*-fosfaţi; uridilil-*3'*,*5'* şi uridin-*3'*-fosfaţi; adenilil-*3'*,*5'* şi uridin-*3'*-fosfaţi; şi uridilil-*3'*,*5'* şi citidin-*3'*-fosfaţi. Totodată s-a mai observat că această enzimă nu acţionează asupra nucleotizilor purinici şi pirimidinici ciclici. Ulterior, prin cercetări efectuate asupra unor acizi nucleici sintetici, ca acizii policitidilic şi poliuridilic, sau pe produşi de degradare ai ARN obţinuţi cu RN-aza pancreatică, s-a ajuns la concluzia că această enzimă scindează într-o primă etapă moleculele înalt polimerizate de ARN, în mai multe polinucleotide cu greutate moleculară mică. În etapa următoare, fragmentele polinucleotidice sînt hidrolizate în continuare pînă la dinucleotide. Scindarea începe la capătul care pre-

zintă o grupare *3'*-fosforică. După cum constată Reddi (1960), dinucleotidele rezultate din această hidroliză sînt rezistente la acţiunea enzimei. Prin cercetările amintite se ajunge la concluzia că fosfodiesteraza are două moduri de acţiune, şi anume unul endo- şi altul exocelular.

Anderson E. P., Heppel L. A. (1961) (citat de Dirheimer G., 1963).
Bacher J. E., Allen F. W. (1950), J. biol. Chem., **183**, 641.
Brown D. M., Dekker E. A., Todd A. R. (1952), J. chem. Soc., **185**, 2 715.
Brown D. M., Magrath D. I., Neilson A. H., Todd A. R. (1956), Nature, **177**, 1 124.
Brown D. M., Magrath D. I., Todd A. R. (1952), J. chem. Soc., 2 708.
Brown D. M., Todd A. R. (1952), J. chem. Soc., 44.
Brown D. M., Todd A. R. (1952 *b*), J. chem. Soc., 52.
Brown D. M., Todd A. R. (1955), în *Nucleic acids*, sub red. E. Chargaff şi J. N. Davidson, Academic Press, New York, vol. I, p. 419.
Chargaff E., Magasanik B., Vischer E., Green C., Doniger R., Elson D. F. (1950), J. biol. Chem., **186**, 51.
Cohn W. E. (1950), J. amer. chem. Soc., **72**, 1 471.
Cohn W. E., Volkin E. (1953), J. biol. Chem., **203**, 319.
Cunningham L. (1958), J. amer. chem. Soc., **80**, 2 546.
Cunningham L., Cotlin de Garilhe (1956) (citat de Cunningham L., 1958).
Davidson J. N., Smellie R. M. S. (1952), Biochem. J., **52**, 594.
Dirheimer G. (1963), Biol. méd., **2**, 125.
Dimroth K., Witzel H., Mirbach H., Hülsen W. (1959), Ann. Chem., **620**, 94.
Dubos R., Thomson R. H. S. (1938), J. biol. Chem., **124**, 501.
Elson D. F. (1950), J. biol. Chem., **186**, 51.
Elson D. F. (1959), Biochim. biophys. Acta, **36**, 372.
Fraenkel-Conrat H., Singer B., Sugiyama T. (1962), în *Acides ribonucléiques et polyphosphates*, C.N.R.S., Paris, p. 241.
Frisch-Niggemeyer W., Reddi K. (1957), Biochim. biophys. Acta, **26**, 40.
Grunberg-Manago M., Ortiz P. J., Ochoa S. (1955), Science, **122**, 907.
Gulland J. M., Jackson E. M. (1938), J. chem. Soc., 1 492.
Heppel L. A., Hilmoe R. J. (1951), J. biol. Chem., **188**, 665.
Heppel L. A., Hilmoe R. J. (1955), în *Methods in enzymology*, sub red. Colowick, Kaplan, Academic Press, New York, p. 565.
Heppel L. A., Oritz P. J., Ochoa S. (1956), Science, **123**, 415.
Heppel L. A., Oritz P. J., Ochoa S. (1957 *a*), J. biol. Chem., **229** 679.
Heppel L. A., Oritz P. J., Ochoa S. (1957 *b*), J. biol. Chem., **229**, 695.
Hirs C. H. W. (1954), Fed. Proc., **13**, 230.
Hirs C. H. W., Moore S., Stein W. H. (1953), J. biol. Chem., **200**, 493.
Holden M., Pirie N. W. (1955), Biochem., J. **60**, 39.
Holley R. W., Apgav J., Everett G. A., Madisson J. T., Marquisse M., Mevill S. H., Penswick J. R., Zomir A. (1965), Science, **147**, 1 462.
Jones W. (1904), Z. physiol. Chem., **41**, 101.
Jones W. (1916), J. biol. Chem., **25**, 87.
Jones W., Perkins M. E. (1923), Amer. J. Physiol., **55**, 557.
Kerr S. E., Seraidayan K., Wargon M. (1949), J. biol. Chem., **181**, 761, 773.
Kunitz M. (1940), J. gen. Physiol., **24**, 15.
Levene P. A. (1923), J. biol. Chem., **55**, 9.
Levene P. A., Dmochowski A. (1931), J. biol. Chem., **93**, 563.
Loring H. S., Fairley J. L., Bortner H. W., Seagran H. L. (1952), J. biol. Chem., **197**, 809.

Scanned with OKEN Scanner

Magasanik B., Chargaff E. (1951), Biochim. biophys. Acta, **7**, 396.
Maver M. E., Greco A. E. (1949), J. biol. Chem., **181**, 861.
Markham R., Mathews R. E. F., Smith J. D. (1954), Nature, **173**, 537.
Markham R., Smith J. D. (1951 *a*), Rad. Res., **4**, 344.
Markham R., Smith J. D. (1951 *b*), Biochem. J., **49**, 401.
Markham R., Smith J. D. (1952), Biochem. J., **52**, 565.
Marrian D. H., Spicer V. L., Balis M. E., Brown G. B. (1951), J. biol. Chem., **189**, 533.
Marshak A., Vogel H. J. (1951), J. biol. Chem., **189**, 597.
Massart L., Peters G., Vanhauke H. (1947), Experientia, **3**, 494.
Matthews R. E. F., Smith J. D. (1957), Nature, **180**, 375.
McCully K. S., Cantoni G. L. (1961), Biochim. biophys. Acta, **51**, 190.
Merrifield R. B., Wolley D. W. (1952), J. biol. Chem., **197**, 521.
Nishimura S. (1960), Biochim. biophys. Acta, **45**, 15.
Noai-Tada M., Sato-Asano K., Egami F. (1959), J. Biochem. (Tokyo), **46**, 757.
Preiss J., Diekmann M., Berg P. (1961), J. biol. Chem., **236**, 1 748.
Privat de Garilhe M., Laskowski M. (1956), J. biol. Chem., **223**, 661.
Razzel W. E., Khorana H. G. (1961) (citaţi de Dirheimer G., 1963).
Reddi K. K. (1959), Biochim. biophys. Acta, **36**, 132.
Reddi K. K. (1960), Nature, **187**, 79.
Reddi K. K., Knight C. A. (1957), Nature, **180**, 374.
Sato K., Egami F. (1957), J. Biochem. (Tokyo), **44**, 753.
Schmidt G., Cubiles R., Tannhauser S. J. (1950), J. cell. comp. Physiol., **38**, supl., 161.
Schmidt G., Cubiles R., Zöllner N., Hecht L., Strickler N., Seraidarian K., Seraidarian M., Tannhauser S. J. (1951), J. biol. Chem., **192**, 715.
Schmidt G., Levene P. A. (1938), J. biol. Chem., **126**, 423.
Smith J. D., Markham R. (1950), Biochem. J., **46**, 509.
Smyth D. G., Stein W. H., Moore S. (1963), J. biol. Chem., **238**, 227.
Spahr P. F. (1964), J. biol. Chem., **239**, 3 716.
Spahr P. F., Hollingworth B. R. (1961), J. biol. Chem., **236**, 823.
Spahr P. F., Schlesinger D. (1963), J. biol. Chem., **238**, 2 251.
Staehelin M. (1961 *a*), Biochim. biophys. Acta, **49**, 11.
Staehelin M. (1961 *b*), Biochim. biophys. Acta, **49**, 20.
Staehelin M. (1961 *c*), Biochim. biophys. Acta, **49**, 27.
Stendel H., Peiser E. (1922), Z. physiol. Chem., **120**, 292.
Tomlison N. (1958), Canad. J. Biochem. Physiol., **36**, 633.
Tuve T. W., Anfinsen C. B. (1960), J. Biol. Chem., **235**, 3 437.
Uzawa T. (1932), J. Biochem. (Tokyo), **15**, 19.
Vischer E., Chargaff E. (1948), J. biol. Chem., **176**, 715.
Volkin E., Carter C. E. (1951), J. amer. chem. Soc., **73**, 434.
Volkin E., Cohn W. E. (1953), J. biol. Chem., **205**, 767.
Wade W. E. (1961), Biochem. J., **78**, 457.
Witzel H. (1960), Ann. Chem., **635**, 182.
Witzel H. (1963), în *Progress in nucleic acids research*, sub red. J. N. Davidson, W. E. Cohn, Academic Press, New York, vol. II, p. 221.
Wyatt G. R. (1951), Biochem. J., **48**, 584.
Zamenhof S., Chargaff E. (1949), J. biol. Chem., **178**, 531.
Zöllner N., Felling J. (1953), Amer. J. Physiol., **173**, 223.
Zytko J., Lamirande G., Allard C., Cantero A. (1958), Biochim. biophys. Acta, **27**, 495.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 3

FOTOCHIMIA ACIZILOR RIBONUCLEICI

Absorbția în ultraviolet

Multe din cunoştinţele actuale despre proprietăţile fizico-chimice ale acizilor nucleici se datoresc cercetărilor efectuate cu ajutorul metodei spectrofotometrice. În acest mod s-au obţinut informaţii extrem de preţioase asupra structurii primare şi secundare a oligo- şi polinucleotidelor. Efectele hiper- şi hipocrome observate după acţiunea unor agenţi fizici sau chimici asupra macromoleculelor de acizi nucleici au permis precizarea configuraţiei acestor molecule.

Degradarea acizilor nucleici este însoţită de o creştere a absorbţiei lor în ultraviolet, măsurată în mod obişnuit la 260 mμ, regiunea de absorbţie maximă. Acest efect hipercrom demonstrează că moleculele intacte de acizi nucleici au valoarea absorbţiei mai mică decît a nucleotidelor ce îi compun. S-a observat că întotdeauna acizii nucleici înalt polimerizaţi prezintă un efect hipocrom, variabil între 25 şi 45%, comparat cu suma absorbţiei moleculare a nucleotidelor sale, determinată separat. Cauza acestei comportări s-a dovedit a fi în directă legătură cu structura moleculară a acizilor nucleici. De aceea, cercetările spectrofotometrice prezintă un interes deosebit pentru stabilirea configuraţiei moleculare sau a efectului pe care îl au o serie de factori asupra macromoleculelor polinucleotidice. Fără îndoială că efectul hipocrom (înţelegînd prin aceasta procesul descreşterii absorbţiei, iar în cazul efectului hipercrom creşterea procentului absorbţiei la 260 mμ) se datoreşte modificărilor apărute la grupele cromofore ale bazelor purinice şi pirimidinice din interiorul lanţului molecular. Acestea sînt singurele componente ale acizilor nucleici care absorb în această regiune spectrală. Se admite astăzi că orice proces care determină creşterea interacţiunii dintre heterociclurile bazelor azotate are drept consecinţă directă accentuarea efectului hipocrom. O sporire suplimentară a acestui efect s-ar putea datora şi legăturilor de hidrogen care se formează în interiorul aceluiaşi lanţ molecular sau între diferiteanţuri.

Scanned with OKEN Scanner

Este important de arătat că oligonucleotidele şi chiar dinucleotidele suferă un efect similar în comparaţie cu nucleotidele care le compun (Michelson, 1958; De Garilhe şi Laskowski, 1959). Cercetările realizate asupra acestora a permis obţinerea unor date privind natura efectului hipocrom. Astfel, Janon şi Shugar (1960), ca şi Wierzchowski şi Shugar (1960) au dovedit că hipocromicitatea adenil-*3'*,*5'*-uridinei şi a adenilil-*3'*, *5'*-citidin-*3'*-fosfatului dispare dacă se saturează dubla legătură $C_4 = C_5$ a ciclului pirimidinic prin hidrogenare sau fotoliză. În acest mod s-au adus argumente în favoarea rolului pe care îl au sistemele electronilor π în manifestarea efectului hipocrom. O dovadă în plus adusă de aceşti autori a constat în faptul că derivaţii obţinuţi prin fotoliză şi-au recîştigat, prin încălzire, hipocromicitatea iniţială.

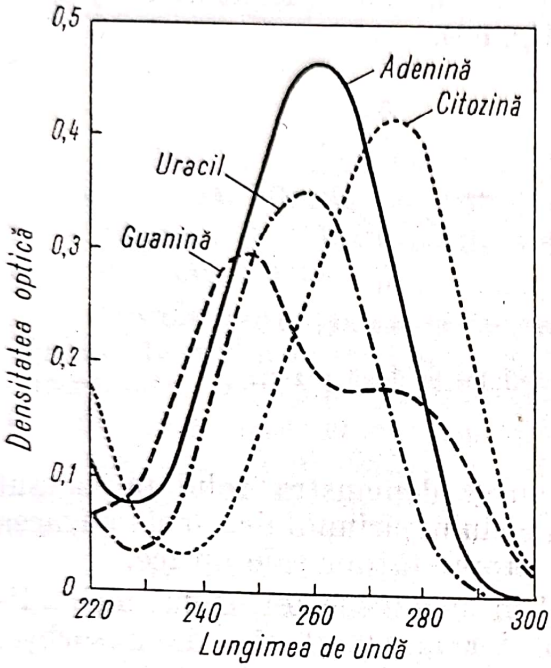
După Michelson (1963), interpretarea cea mai plauzibilă a naturii efectului hipocrom observat la oligo- şi polinucleotide ar fi următoarea: bazele purinice şi pirimidinice, fiind aşezate în straturi suprapuse, dau posibilitatea electronilor π ai ciclurilor adiacente nu numai să stabilizeze configuraţia moleculei, dar totodată să producă „specii" noi electronice, care au absorbţia în ultraviolet, caracteristică moleculei întregi. Prin urmare, nu este vorba de o însumare a absorbţiei individuale a mononucleotidelor componente, ci de un fenomen mult mai complex. Interacţiunea sistemelor electronilor π are, de asemenea, un important efect asupra grupărilor ionizabile ale purinelor şi pirimidinelor, care participă direct în sistemele cromofore. Pe de altă parte, perturbarea grupelor cromofore prin ionizare sau prin legături de hidrogen influenţează direct interacţiunea electronilor π, amintită mai sus. Rezultatul probabil al acestor schimbări este deplasarea laterală sau separarea bazelor datorită unor forţe de repulsie care iau naştere între purinele sau pirimidinele încărcate cu acelaşi semn. Ionizarea bazelor a fost considerată chiar ca un factor posibil al mutaţiilor (Lawley şi Brookes, 1962).

Într-adevăr, influenţa pH-ului sau a forţei ionice asupra macromoleculelor de ARN au drept consecinţă schimbarea configuraţiei acestora, însoţită de modificarea absorbţiei în ultraviolet a întregii molecule.

Importanţa determinării efectului hipercrom ce apare în cursul încălzirii diferitelor polinucleotide este discutată în subcapitolul în care se studiază structura secundară a ARN. Aceste cercetări au condus la precizarea structurii secundare a ARN.

Purinele şi pirimidinele. Ambele clase de substanţe prezintă o puternică absorbţie în ultraviolet în jurul lungimii de undă de 260 mμ (fig. 61). Întrucît aceşti compuşi conţin grupări cromofore ionizabile, studiile proprietăţilor lor optice trebuie interpretate întotdeauna după un control riguros al valorii pH-ului soluţiei. De exemplu, citozina la pH 1 prezintă maximul de absorbţie la 276 mμ, în timp ce la pH 7,2 maximul ei este situat la 267 mμ. În afară de deplasarea maximului de absorbţie se observă în acelaşi timp şi variaţia amplitudinii extincţiei, care poate să

crească sau să scadă în funcţie de pH, cu valori apreciabile care în unele cazuri sînt de aproximativ 70%. După McLaren şi Shugar (1964), aceste modificări se datoresc disocierii grupelor carbonilice şi aminice conform echilibrelor arătate în figura 62.



←*Fig. 61.* — Curbele de absorbţie în ultraviolet ale bazelor azotate ale acizilor ribonucleici.

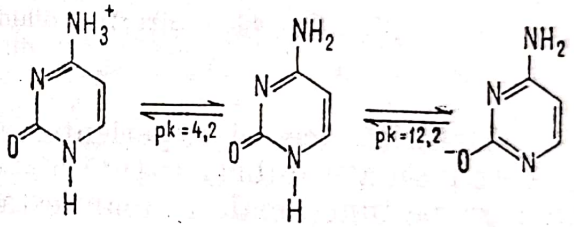


Fig. 62. — Disocierea grupelor ionizabile ale citozinei.

Existenţa acestor echilibre a fost pusă în evidenţă şi în cazul acizilor nucleici, dovedindu-se deosebit de utilă pentru cercetările destinate determinării structurii moleculare.

În urma studiilor efectuate asupra unor purine, pirimidine şi derivaţi ai triazolopirimidinelor, s-a ajuns la concluzia că cromoforul principal al purinelor şi pirimidinelor este $-\overset{|}{C}=\overset{|}{C}-\overset{|}{C}=N-$ şi, în unele cazuri, $-\overset{|}{C}=\overset{|}{C}-\overset{|}{C}=O$ (Cavalieri şi colab., 1948). Se poate admite astăzi că în orice caz particular cromoforul acestor substanţe este rezultanta dintre una din cele două sisteme conjugate menţionate şi restul moleculei. La aceasta se adaugă, bineînţeles, şi efectul disocierii grupelor funcţionale conform echilibrelor ilustrate mai sus.

La pH neutru, dihidrouracilul, spre deosebire de uracil, nu prezintă maximul de absorbţie caracteristic la 260 mμ. În schimb, în mediu alcalin la pH 13 are un maxim de absorbţie nou, situat la 230 mμ (Janon şi Shugar, 1960). Dispariţia absorbţiei dihidrouracilului la pH neutru se datoreşte atît faptului că la acest pH substanţa are legătura 5′—6′ saturată prin hidrogenare, cît şi formei ceto în care se găsesc grupele sale carbonilice. A doua

cauză determină ca dihidrouracilul să nu aibă legături duble conjugate, ceea ce explică comportarea sa menționată. În schimb, în mediul alcalin, apariția maximului de absorbție de la 230 mμ se datorește disocierii sale, în timpul căreia gruparea 2 carbonilică se conjugă cu legătura dublă 3=4. Prin acest mecanism ia naștere un sistem nou de legături conjugate, responsabil de absorbția de la 230 mμ (fig. 63).

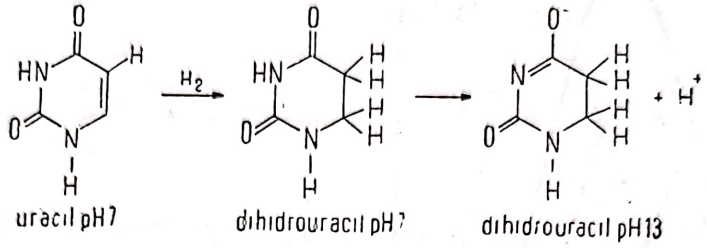


Fig. 63. — Structura dihidrouracilului la două pH-uri diferite.

Datorită acestei experiențe, s-a putut demonstra rolul important pe care îl au atît dubla legătură 5′=6′ a ciclului pirimidinic, cît și ionizarea unor grupe funcționale în manifestarea proprietăților sale optice.

Deoarece dihidrouracilul este labil în mediu alcalin, ciclul pirimidinic se desface în dreptul legăturii 3′—5′, iar maximul său de absorbție de la 230 mμ dispare în scurt timp.

Natura tranzițiilor electronice responsabile de absorbția în ultraviolet a bazelor purinice și pirimidinice a fost studiată de diverși cercetători.

În cazul purinelor benzile de absorbție sînt atribuite la două tranziții polarizate perpendicular de tipul $\pi \rightarrow \pi^*$, independente și mutuale. Ele includ toți electronii de conjugare ai ambelor cicluri pirimidinice și imidazolice. Atît pentru purine, cît și pirimidine se mai admite existența unei tranziții de tipul $n \rightarrow \pi^*$, a cărei intensitate este însă mult mai slabă. Totodată, momentele tranziției $n \rightarrow \pi^*$, fiind polarizate în afara planului heterociclic, determină în polinucleotidele elicoidale ca tranzițiile $n \rightarrow \pi^*$ să fie paralele cu axul moleculei, în timp ce tranzițiile $\pi \rightarrow \pi^*$ care sînt polarizate în planul heterociclurilor sînt perpendiculare pe axa helixului (McLaren și Shugar, 1964).

Absorbția în ultraviolet a acizilor ribonucleici. Conținutul în apă al diferitelor preparate de acizi nucleici variază de la caz la caz. În același timp, îndepărtarea apei nu poate fi realizată întotdeauna fără ca preparatul să nu sufere unele modificări. Din acest motiv raportarea valorii densității optice la unitatea de greutate este, în cazul acizilor nucleici, supusă unor erori evidente.

Pentru a îndepărta sursele de erori menționate, Chargaff și Zamenhof (1948) au sugerat ideea de a raporta absorbanța acizilor nucleici la

conţinutul lor în fosfor. Ideea s-a bazat pe observaţia după care lanţurile polinucleotidice conţin un atom de fosfor pentru o bază azotată. În acest mod există un etalon stabil pentru aprecierea densităţii lor optice.

Chargaff şi Zamenhof au recomandat ca absorbtivitatea moleculară a acizilor nucleici ε (P) să se calculeze după relaţia :

$$\varepsilon\,(P) = \frac{D}{C},$$

în care D este densitatea optică a unui strat de lichid de 1 cm grosime, iar C reprezintă cantitatea de atomi gram de fosfor dintr-un litru de soluţie de acid nucleic.

Marele avantaj al acestui sistem este acela de a putea compara între ele diferite probe de acizi nucleici. S-a observat însă că valorile $\varepsilon\,(P)$ obţinute chiar pentru acelaşi preparat de acid nucleic arată o slabă reproductibilitate. Cu tot acest inconvenient, determinarea valorii $\varepsilon\,(P)$ a unui acid nucleic oarecare a rămas şi astăzi una din probele principale de caracterizare a nativităţii sale. În cazul ARN de diferite proveniențe s-au găsit valori ale $\varepsilon\,(P)$ cuprinse între 7 000 şi 11 000. Pentru un acid dezoxiribonucleic cifrele variază între 6 000 şi 9 000. În general, valorile scăzute ale $\varepsilon\,(P)$ sînt un indiciu că produsul este nativ, în timp ce valorile crescute se întîlnesc, de obicei, la preparatele degradate. O dovadă evidentă a acestei comportări a fost obţinută prin determinarea valorii $\varepsilon\,(P)$ a soluţiilor de ARN hidrolizaţi (tabelul 2). Datele cuprinse în acest tabel arată că valorile

Tabelul 2

Valorile $\varepsilon\,(P)$ pentru unii acizi ribonucleici

Sursa	$\varepsilon\,(P)$	$\varepsilon\,(P)$ după hidroliza alcalină	Creşterea %	Referinţa
Drojdie	8 700	11 900	37	Magasanik şi Chargaff (1951)
Ficat de porc	600	11 100	29	Magasanik şi Chargaff (1951)
Ficat de şoarece	8 190	10 700	31	Tsuboi şi Stowell (1950)
Pancreas de viţel	7 750	9 570	24	Kay şi Dounce (1953)

$\varepsilon\,(P)$ sînt în general cu aproximativ 30% mai mari atunci cînd ARN este hidrolizat. Acţiunea unor agenţi chimici sau fizici asupra preparatelor de acizi nucleici poate fi apreciată şi prin determinarea directă a valorii absorbţiei soluţiilor lor comparativ cu acelea ale probelor martor. Primele analize ale lui Kunitz (1946) au arătat că hidroliza ARN cu RN-ază este însoţită de o mică schimbare a valorii absorbţiei soluţiei sale. Mai tîrziu, Tsuboi (1950) a demonstrat însă că preparatele de ARN întrebuinţate de

Kunitz au fost, probabil, foarte degradate, deoarece în urma tratamentului cu RN-ază produşii înalt polimerizaţi prezintă o creştere a absorbţiei cu aproximativ 20% faţă de martori.

Acizii ribonucleici au maximul de absorbţie în ultraviolet la 260 mμ, iar minimul la aproximativ 234 mμ. De la caz la caz s-au observat însă, la diferiţi acizi nucleici, deplasări de 1—2 mμ ale maximului sau minimului de absorbţie.

În figura 64 este redat spectrul de absorbţie în ultraviolet a unui ARN studiat de noi. Acesta prezintă maximul de absorbţie la 259 mμ, iar minimul la 232 mμ. Tratamentul acestui ARN cu KOH 0,5 N timp de 20 de ore, la temperatura camerei, a determinat creşterea absorbţiei sale în ultraviolet cu 29% faţă de martor. Hidroliza enzimatică cu RN-ază

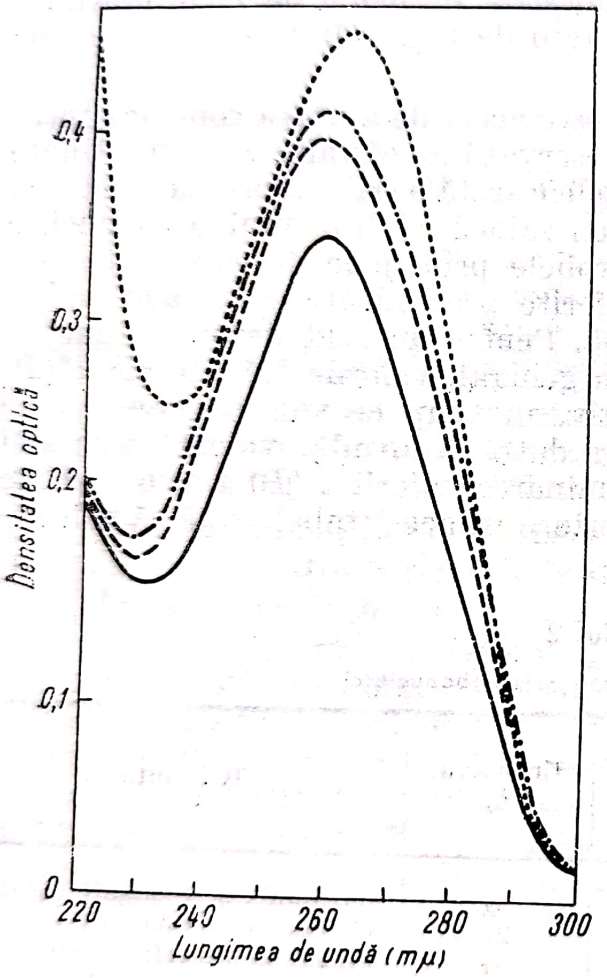


Fig. 64. — Curba de absorbţie a ARN extras cu fenol din ficatul de şoarece (——); acelaşi produs hidrolizat cu RN-ază timp de 30 min (- - - - -) şi 20 de ore (- · - · - ·) sau cu KOH 0,5 N timp de 20 de ore (. . . . .) (după Popa şi Cruceanu).

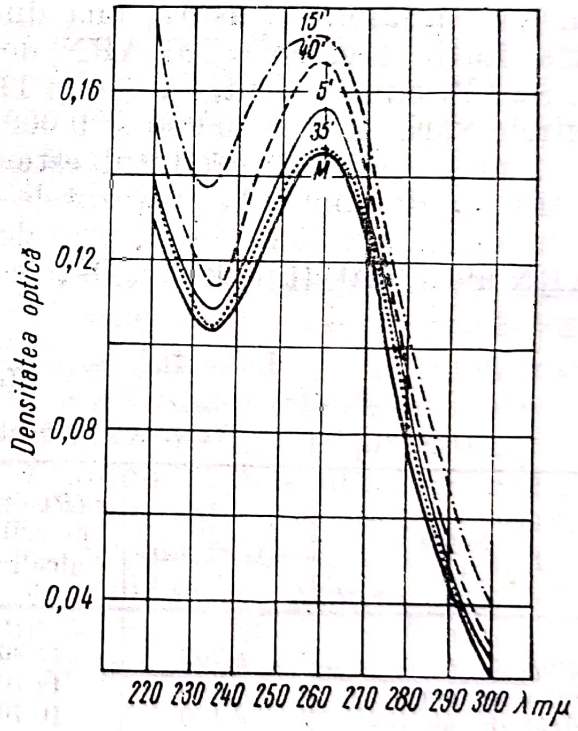


Fig. 65. — Curbele de absorbţie a ARN extras cu fenol din creierul de şoarece. Modificările efectului hipercrom în funcţie de timpul de încălzire la 75°C. Determinările au fost făcute după răcirea lentă a probelor (după Portocală şi colab., 1963).

ne-a condus în acest caz la obţinerea unor efecte hipercrome de intensitate mai redusă. Astfel, după 30 de minute de acţiune a RN-azei, creşterea absorbţiei a fost de numai 16%, în timp ce după 20 de ore de 20%.

Rezultatele noastre sînt în concordanţă cu datele relatate mai sus, comunicate de Tsuboi (1950), precum şi cu cele ale lui Magasanik şi Chargaff (1951), care au arătat că degradarea cu alcali pînă la mononucleotide a ARN produce o hipercromicitate de 20—40%.

Este important de arătat că şi în urma încălzirii ARN îşi măreşte valoarea absorbţiei. Dar, spre deosebire de variaţiile observate în cazul tratamentului cu RN-ază, alcalii sau acizii, care determină variaţii întotdeauna ireversibile, modificările absorbţiei soluţiilor de ARN induse de temperatură pot fi în funcţie de condiţiile experimentale parţial sau total reversibile.

Figura 65 reprezintă curbele de absorbţie în ultraviolet a unui ARN tisular încălzit la 75° perioade de timp cuprinse între 5 şi 40 de minute. După cum se poate vedea pe figură, încălzirea ARN la 75° C a avut ca efect general creşterea valorii absorbţiei sale. Totodată se remarcă că proba încălzită timp de 35 de minute prezintă o curbă de absorbţie care se suprapune peste aceea a martorului. Prin urmare, modificările induse de temperatură sînt uneori reversibile (Portocală şi colab., 1963).

Comportarea diferită a ARN faţă de unii agenţi chimici sau fizici se datoreşte mecanismului particular de acţiune al acestora. RN-aza, ca şi alcalii, produce scindarea lanţului macromolecular, iar creşterea absorbţiei se datoreşte eliberării unor grupe cromofore în urma acestui tratament. Aceste modificări sînt ireversibile, şi din această cauză valoarea absorbţiei acizilor ribonucleici degradaţi este întotdeauna mai crescută decît aceea a probelor native. Pe de altă parte, căldura şi alţi agenţi fizici sau chimici acţionează în primul rînd asupra legăturilor de hidrogen intramoleculare ale acizilor nucleici pe care le desface cu uşurinţă. În urma răcirii, legăturile de hidrogen lezate se pot reface după acelaşi model sau după un aranjament apropiat de cel iniţial. Ca o consecinţă a acestui fapt, absorbţia soluţiei poate fi identică sau diferită de aceea a probelor-martor. Ca urmare a celor arătate mai înainte, se poate afirma că modificările absorbţiei unei soluţii de acid nucleic, în urma acţiunii unui agent fizic sau chimic, se poate datora atît schimbărilor suferite de structura primară, cît şi de către cea secundară. Totodată, trebuie precizat că în mod obişnuit metoda spectrofotometrică pune în evidenţă ansamblul acestor modificări, astfel încît precizarea mecanismului de acţiune al unor agenţi asupra structurii acizilor nucleici necesită contribuţia şi a unei alte metode de analiză, în afară de aceea a spectrofotometriei.

Pentru a se cunoaşte natura efectului hipercromic s-au realizat numeroase cercetări. Studiile efectuate asupra unor oligonucleotide preparate prin sinteză chimică, ca şi asupra polinucleotidelor sintetizate enzimatic, au adus unele precizări în această problemă.

Concluziile la care s-a ajuns în cazul oligonucleotidelor au fost astfel sistematizate de McLaren şi Shugar (1964):

a) Efectul hipercrom este dependent de compoziţia în nucleotide, ca şi de secvenţa nucleotidelor din lanţ.

b) Variaţiile hipercromicităţii în funcţie de pH exclud posibilitatea ca în cazul oligonucleotidelor mici, sursa principală a efectului hipercrom să fie generată de legăturile de hidrogen.

c) Întrucît valorile pK ale grupelor ionizabile prezintă o schimbare apreciabilă la oligonucleotidele mici, ca şi faptul că acestea din urmă influenţează metacromazia coloranţilor bazici conduc la concluzia că acestea posedă o configuraţie definită. Modificările spectrale ale acestor compuşi se datoresc formării unor noi cromofori care provin din interacţiunea sistemului de electroni π ai ciclurilor adiacente. Orbitalii electronici rezultaţi se extind peste două sau mai multe cicluri aromatice. În acelaşi timp, energia lor totală este mai scăzută, iar din punct de vedere geometric aria cromoforului este mai mică.

Pe de altă parte, studiile realizate cu polinucleotide sintetice au dovedit efectul major pe care îl are interacţiunea dintre două sau trei lanţuri asupra efectului hipercrom. Este suficient să reamintim aici un fapt experimental, discutat în capitolul de structură, şi anume că formarea complecşilor de tipul poli - A + poli - U este însoţită de un puternic efect hipocrom. Această observaţie, alături de altele, a permis formularea structurii secundare a acizilor nucleici. Acest tip de analize a permis să se cunoască mecanismul de interacţiune a lanţurilor polinucleotidice.

Lungimea lanţului polinucleotidic s-a dovedit a fi un alt factor important. Produşii înalt polimerizaţi au prezentat un efect hipercrom (în urma hidrolizei) mai mare decît cei care au avut greutatea moleculară mai mică. Această comportare a fost atribuită unor schimbări ale configuraţiei moleculelor înalt polimerizate, fapt ce determină ca în stare nativă aceştia să prezinte un efect hipocrom suplimentar.

Totalitatea cercetărilor efectuate asupra proprietăţilor optice ale ARN au permis să se tragă cîteva concluzii mai importante :

a) ARN naturali în stare nativă prezintă valoarea absorbţiei lor cu aproximativ 30% mai mică decît valoarea moleculară a mononucleotidelor ce îi compun (efect hipocrom).

b) În urma acţiunii hidrolitice a acizilor, alcalilor sau RN-azei asupra ARN se observă o creştere a valorii absorbţiei soluţiilor cu 20—40% (efect hipercrom).

c) Formarea şi desfacerea regiunilor ordonate dublu-elicoidal ale lanţurilor polinucleotidice sînt însoţite de modificarea valorii spectrului lor de absorbţie (efecte hipo- şi hipercrome). Interacţiunea orbitalilor electronilor π ai ciclurilor aromatice adiacente este o cauză a absorbţiei lor anormal de mică.

d) Legăturile internucleotidice influenţează într-o mică măsură valoarea absorbţiei lor.

Studiul structurii secundare a ARN prin metoda spectrofotometrică. Printre metodele întrebuinţate pentru stabilirea structurii secundare a ARN, analiza spectrofotometrică a avut un rol principal.

Scanned with OKEN Scanner

În afară de trasarea curbei de tranziţie termică a unui acid nucleic, a cărei semnificaţie am discutat-o o dată cu structura secundară a ARN, informaţii suplimentare asupra arhitecturii macromoleculelor se pot obţine prin determinarea spectrofotometrică a trei parametri principali (Mahler şi da Silva-Pereira, 1962) :

A) Creşterea totală a hipercromicităţii (R_Δ), care se defineşte prin :

$$R_\Delta = \frac{A_{max.} - A_{22}}{A_{22}},$$

în care A_{max} este valoarea maximă a absorbţiei, iar A_{22} valoarea absorbţiei soluţiei de acid nucleic la 22° C.

B) Temperatura de tranziţie (sau „topire") mijlocie (Tm), care se calculează din :

$$\frac{At - A_{22}}{A_{22}} = 0{,}5\ R_\Delta = Tm,$$

în care At este valoarea absorbţiei la temperatura la care relaţia este satisfăcută.

C) Lăţimea tranziţiei (Δ 2/3) este definită de zona de temperatură pentru care :

$$\frac{At - A_{22}}{A_{22}}$$

se găseşte între $0{,}5 \pm 0{,}33$ a R_Δ.

Cu ajutorul curbei de tranziţie şi al celor trei parametri arătaţi mai sus se poate caracteriza configuraţia macromoleculelor de acizi nucleici. Semnificaţia celor trei parametri poate fi pe scurt astfel rezumată : în cazul unui polinucleotid mono- sau bicatenar, valoarea lui R_Δ permite să se aprecieze conţinutul său în regiuni dublu spiralate ; valoarea ridicată a R_Δ este o dovadă că produsul are o structură secundară stabilă şi bine organizată. De exemplu, ADN extras din timusul de viţel, care are toate bazele celor două lanţuri angajate în legături de hidrogen, prezintă $R_\Delta = 43{,}5\%$ (Doty şi colab., 1959). Pentru ARN din VMT, valoarea R_Δ este de 36%, iar a ARN-*S* din drojdie, specific pentru tirozină, este de numai 22% (Mahler şi da Silva-Pereira, 1962). În general, ARN-*S* prezintă o hipercromicitate (R_Δ) între 23% şi 28% (Brown, 1963).

S-a observat însă că acest parametru suferă o serie de variaţii chiar pentru moleculele bispiralate de ADN (Doty şi colab., 1959). Din această cauză întrebuinţarea lui nu pare a fi întotdeauna indicată.

În schimb, valoarea Tm apare a fi în strictă dependenţă de compoziţia în baze atît pentru ADN cît şi pentru ARN (Doty şi colab., 1959 ; Cox şi Littauer, 1960 ; Wallace şi Ts'o, 1961 ; Spirin, 1962).

Ultimul parametru, valoarea Δ 2/3, permite aprecierea eterogenităţii compoziţiei acizilor nucleici, dar mai ales lungimea şi numărul regiunilor ordonate ale macromoleculei, probabil sub formă de duble spire (Doty şi colab., 1959 ; Boedtker, 1960 ; Mahler şi da Silva-Pereira, 1962).

Scanned with OKEN Scanner

Iradierea cu raze ultraviolete (RUV)

Diferitele efecte nocive observate la unele microorganisme supuse acţiunii RUV se datoresc reacţiilor fotochimice induse de aceste radiaţii în macromoleculele lor biologic active. Fără îndoială că RUV acţionează în primul rînd asupra grupărilor cromofore existente în aceste molecule, grupări sensibile la pragul de energie a acestei radiaţii.

Sub influenţa lor se pot produce reacţii care determină ruperea unor legături chimice (însoţite, de obicei, de efecte letale), reacţii de dimerizare inter- şi intramoleculare, reacţii de oxidare consecutive formării unor radicali liberi, polimerizări etc.

În majoritatea cazurilor s-a studiat efectul radiaţiilor a căror lungime de undă era cuprinsă între 190 mμ şi 310 mμ.

Efectul radiaţiilor cu lungimi de undă cuprinse între 110 şi 180 mμ (Blanck şi Arnold, 1935), precum şi cele dintre 125 şi 160 mμ (Curran şi

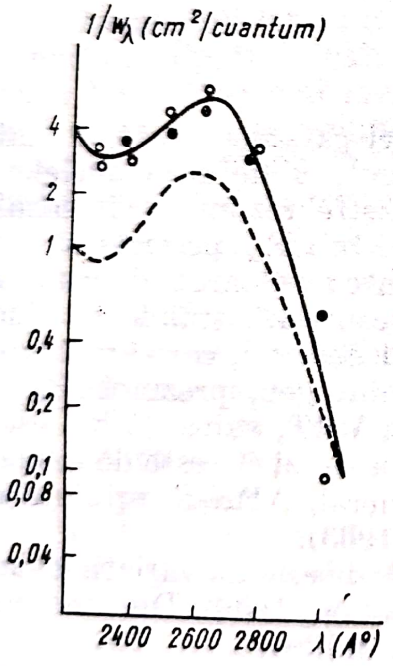


Fig. 66. — „Spectrul de acţiune" al RUV (———) şi spectrul de absorbţie în UV al acizilor nucleici (------) (după Hanawalt şi Setlow, 1960).

Evans, 1938), este asemănător cu acela obţinut la peste 190 mμ. S-a observat însă că, în funcţie de lungimea de undă a radiaţiei, „spectrul de acţiune" al RUV suferă modificări esenţiale. Henri (1914), Gates (1929), Hanawalt şi Setlow (1960) etc., studiind corelaţia dintre spectrul de acţiune a RUV şi lungimea de undă (λ) a radiaţiei, au dovedit că domeniul cu cel mai mare potenţial în ceea ce priveşte efectele asupra structurilor

biologice este cel situat la 260 mμ. Pe de altă parte, este bine cunoscut faptul că maximul de absorbţie al acizilor nucleici este la 260 mμ. De altfel s-a remarcat că spectrul de acţiune biologică al RUV se suprapune perfect spectrului de absorbţie al acizilor nucleici (fig. 66).

Această observaţie a condus în mod logic la ipoteza că RUV acţionează asupra organismelor prin intermediul modificărilor pe care le induce în moleculele de acizi nucleici.

Un alt argument în favoarea aceleiaşi ipoteze a fost adus de numeroasele lucrări experimentale care au dovedit că acizii nucleici au un rol hotărîtor în sinteza proteinelor, în transmiterea caracterelor ereditare etc. Or, acţiunea RUV este îndreptată în mod particular asupra acestor procese biologice. Din această cauză, încă de la primele lucrări efectuate cu RUV, autorii au presupus că ele acţionează asupra macromoleculelor biologic active şi în special asupra acelora care sînt implicate cel mai mult în procesele vitale ale organismelor.

Iradierea bazelor pirimidinice. Cînd acizii nucleici sînt supuşi acţiunii RUV, acestea sînt absorbite cu preponderenţă de baze, care prezină cu aproximaţie un acelaşi maxim de absorbţie, la 260 mμ ca şi întreaga moleculă. Această observaţie a condus la primele cercetări de iradiere a bazelor izolate.

Atunci cînd s-au comparat bazele azotate între ele, în privinţa sensibilităţii la razele ultraviolete, s-a constatat că bazele azotate aparţinînd clasei purinelor — adenina şi guanina — sînt mult mai sensibile decît bazele pirimidinice, citozina, uracilul şi timina. Aproximativ una la fiecare sută de cuante de energie a luminii ultraviolete absorbite de pirimidine alterează moleculele; în cazul purinelor, raportul este de 1 : 10 000. În general numai cîteva cuante absorbite de o moleculă vor fi eficace în producerea unor schimbări permanente. Cercetările care au avut ca scop cunoaşterea mecanismului de acţiune a RUV asupra acizilor nucleici au fost îndreptate în special spre pirimidine (citozina, uracilul şi timina).

Iradierea citozinei. Cercetările întreprinse asupra citozinei au arătat că iradierea ei duce la adiţia unei molecule de apă la dubla legătură $C_5 = C_6$. Încălzirea citozinei „afectate" la temperaturi mici, „biologice", sau acidificarea ei inversează în parte reacţia. Prin urmare, hidratarea citozinei nu pare să fie de o importanţă biologică prea mare. Ecuaţia din figura 67 ilustrează această reacţie reversibilă.

Deşi nu s-a acordat în general prea multă importanţă hidratării citozinei, datorită faptului că ea este reversibilă la temperatura de 37° C sau chiar mai scăzută, reversibilitatea acestei reacţii poate fi mai lentă în cazul acidului nucleic intact decît în cazul bazei izolate. Nu există însă nici o dovadă directă că fenomenul hidratării ar avea loc în detrimentul activităţii biologice a acidului nucleic. Totuşi, el ar putea afecta legătura de hidrogen dintr-un segment al spiralei, determinînd, prin urmare,

Scanned with OKEN Scanner

favorizarea ruperii legăturii de hidrogen, observată de unii autori, sub influenţa RUV.

În afară de adiţia apei la legătura $C_5=C_6$ a moleculei de citozină, aceasta suferă, sub influenţa RUV, în starea îngheţată, o dezaminare (Weinblum, 1961). Produsul rezultat este uracilul, care, în continuare, tot sub influenţa RUV, se dimerizează după reacţia cunoscută (fig. 68).

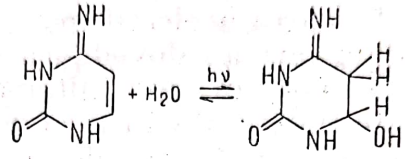


Fig. 67. — Adiţia unei molecule de apă la molecula citozinei sub influenţa RUV.

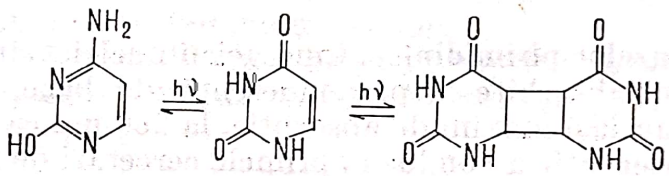


Fig. 68. — Transformarea, sub influenţa RUV, a citozinei în uracil şi dimerizarea ulterioară a acestuia.

Transformarea citozinei în uracil prin dezaminare are o mare importanţă genetică şi poate fi implicată în explicarea unor mutaţii pe care le produc RUV.

În sfîrşit, citozina mai suferă încă o reacţie fotochimică sub influenţa RUV, şi anume dimerizarea ei. Trebuie însă precizat că randamentul reacţiei de dimerizare a citozinei este redus în comparaţie cu acela observat în cazul uracilului sau al timinei. Asupra cauzelor care determină scăderea randamentului de dimerizare a citozinei vom reveni în cele ce urmează.

Iradierea timinei. În soluţie apoasă, timina este aproape insensibilă la iradierea cu RUV. Dacă însă se iradiază timina în soluţie concentrată şi congelată rapid, se înregistrează o sensibilitate remarcabilă a compusului faţă de acest tratament. Doze foarte mici de iradiere determină o conversiune de 60—80% din timină într-un produs care nu prezintă un maxim de absorbţie la 260 mμ (Beukers şi colab., 1958).

Din aceste experienţe s-a dedus că iradierea soluţiei de timină îngheţată favorizează combinarea a două molecule de timină prin formarea unui dimer. Reacţia de adiţie a două molecule de timină se poate formula ca în figura 69.

Spre deosebire de citozina modificată (prin adiţia unei molecule de apă), dimerul de timină este stabil atît la căldură, cît şi la acţiunea acizilor.

Cînd soluţia se decongelează, iradierea cu RUV poate transforma dimerul în cele două molecule de timină iniţiale (reacţia din fig. 69 de la dreapta la stînga). Descompunerea dimerului poate fi pusă în evidenţă prin creşterea bruscă a extincţiei la 260 mμ.

Conversiunea timinei în dimer în soluţii congelate rapid trebuie atribuită, după toate probabilităţile, faptului că prin congelare moleculele

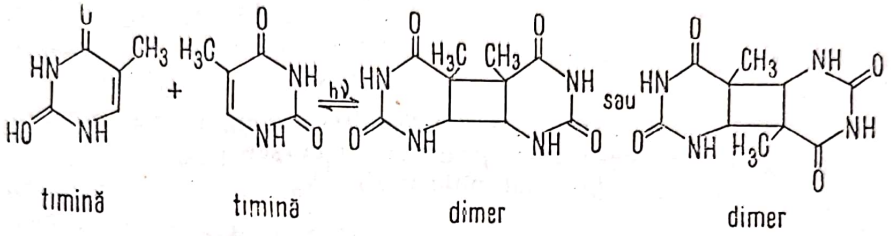


Fig. 69. — Dimerizarea timinei sub influenţa RUV.

se apropie mult unele de altele şi, în consecinţă, reacţiile dintre moleculele de timină excitate vor fi mult mai uşor realizabile decît în soluţie.

Transformarea timinei în soluţiile congelate rapid are loc într-o proporţie mare, iar dimerul se poate obţine relativ uşor şi purifica prin recristalizare. Timina se îndepărtează din amestec prin extracţii repetate ale sedimentului cu etanol absolut. Analiza elementară a dimerului arată o concordanţă perfectă cu aceea a timinei. Distilarea izotermă (Beukers şi Berends, 1961) în soluţie apoasă a arătat că este vorba de un dimer. Spectrul în infraroşu a arătat prezenţa unui vîrf slab la 960 cm^{-1}, care este tipic unui sistem ciclic de ciclobutan. Structura stereochimică exactă a acestui dimer nu este încă pe deplin determinată.

Mecanismul dimerizării timinei, descris mai sus, stă actualmente la baza explicării acţiunii RUV asupra ADN.

Iradierea uracilului. Sinsheimer şi Hastings (1949) au fost primii autori care au iradiat cu doze mici de RUV uracilul în soluţii apoase. Ei au observat că în aceste condiţii spectrul caracteristic al uracilului dispărea, dar putea fi restabilit în diverse moduri. Nu s-a acordat o importanţă prea mare acestei observaţii, pînă cînd s-a remarcat că şi alte baze ale acizilor nucleici suferă un proces similar.

După Moore şi Thompson (1955), dispariţia spectrului caracteristic uracilului s-ar datora unei reacţii fotochimice induse de RUV, şi anume adiţiei unei molecule de apă la o dublă legătură a uracilului (fig. 70).

Shugar şi Wierzchowski (1957) au dovedit că, într-adevăr, saturarea dublei legături $C_5=C_6$ din ciclul pirimidinic, prin adiţia apei, duce la dispariţia benzii de absorbţie de la 260 mμ. După cum se remarcă din ecuaţia din figura 70, reacţia de adiţie este reversibilă.

Reactivarea unor bacterii şi virusuri, după iradierea cu RUV, a fost atribuită de către unii autori acestui fenomen reversibil. Totuşi, prin această hidratare destul de lentă se putea explica cu destulă greutate efectul

nociv extrem de rapid produs de acţiunea iradierii. Există şi alte cauze care fac ca acest mecanism să nu poată fi acceptat în explicarea modificări-

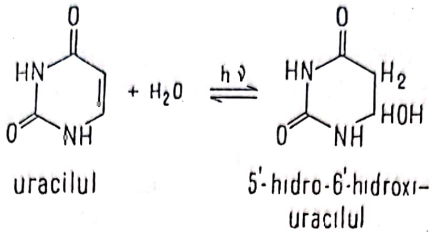


Fig. 70. — Reacţia de adiţie a unei molecule de apă la molecula uracilului sub influenţa RUV.

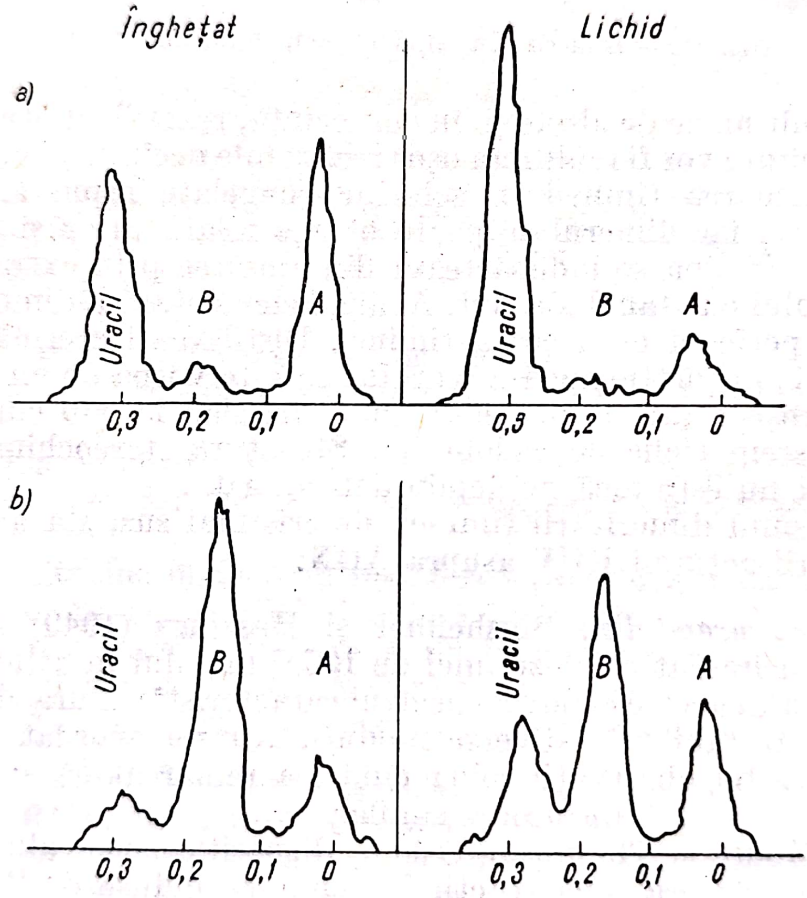


Fig. 71. — Produşii rezultaţi în urma iradierii uracilului cu RUV, evidenţiaţi cu ajutorul cromatografiei pe hîrtie. *A* reprezintă dimerul de uracil, iar *B* produsul de adiţie al unei molecule de apă. Iradierea cu doze mici (*a*) a favorizat formarea dimerului, iar dozele mari (*b*) adiţia apei la molecula uracilului (după Wacker, 1963).

lor produse de RUV. În primul rînd, el nu poate motiva efectul mutagenic al RUV. Într-adevăr, se presupune că acest efect ar fi datorit modificărilor

ADN, iar uracilul nu este prezent în aceste molecule în care el este înlocuit cu timina, care în soluţie apoasă este aproape insensibilă la RUV.

Produsul rezultat după adiţia apei la uracil este relativ stabil şi a putut fi studiat cu ajutorul apei tritiate, precum şi cu uracilul marcat cu H_3 în apă inactivă (izotopic) (Wacker şi colab., 1961 a).

Rörsch şi colab. (1958) au descris un fotoprodus al uracilului, care ulterior a putut fi caracterizat ca un dimer al uracilului.

Recent, Wacker (1963), prin întrebuinţarea uracilului radioactiv sau a unui amestec de apă tritiată şi uracil, a pus în evidenţă modificările fotochimice cantitative şi calitative suferite de uracil sub influenţa RUV. Atît în soluţie apoasă, cît şi după congelare, uracilul-2-C^{14} iradiat dă naştere la doi compuşi (*A* şi *B*). În funcţie de doza de iradiere şi de concentrarea uracilului se obţin cantităţi variabile din cei doi compuşi. Aceştia au fost caracterizaţi cu ajutorul cromatografiei pe hîrtie: *Rf*-ul a fost pentru componenta *A* de 0,04, iar pentru componenta *B* de 0,18, în timp ce uracilul a avut un *Rf* de 0,31 (fig. 71). S-a observat că formarea componentei *A* este favorizată de concentraţiile ridicate de uracil, în timp ce componenta *B* de concentraţiile scăzute. Componenta *A* a fost identificată ca fiind un dimer al uracilului, iar componenta *B* ca produsul rezultat prin adiţia apei la uracil. Dozele mari de RUV conduc la creşterea componentei *B*, în timp ce dozele mici cresc concentraţia componentei *A*.

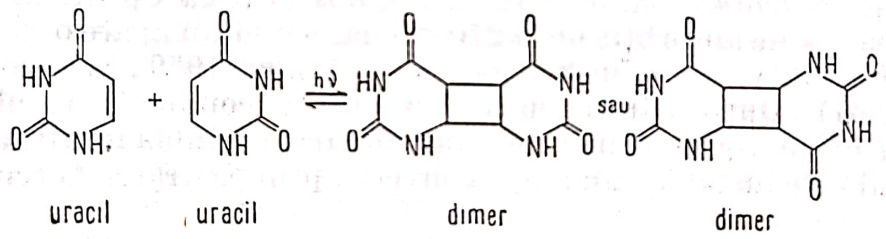


Fig. 72. — Dimerizarea uracilului sub influenţa RUV.

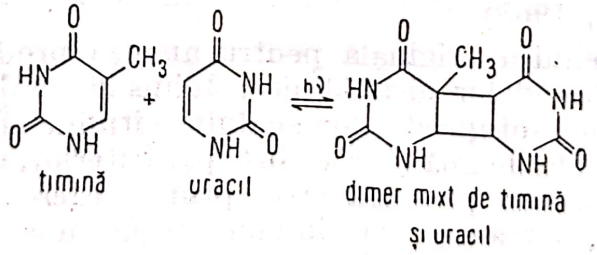


Fig. 73. — Formarea dimerului mixt de timină şi uracil.

Cu această ocazie s-au putut preciza şi alte proprietăţi ale compuşilor *A* şi *B*, şi anume: analiza spectrofotometrică a scos în evidenţă faptul că aceştia nu prezintă maximul de absorbţie la 258 mμ, ceea ce a permis să se conchidă că ambii componenţi au dubla legătură $C_5=C_6$ saturată.

Prin încălzire la 100°, timp de 15 minute, compusul *A* se descompune în uracil. În aceleaşi condiţii şi compusul *B* se descompune, dar cu un randament mai mare de uracil. În soluţie apoasă, compusul *B* este insensibil la iradierea cu RUV, în timp ce compusul *A* este convertit în uracil. Pe de altă parte, dimerul (*A*) este mai stabil în soluţiile acide sau alcaline decît produsul de adiţie a apei (aductul *B*).

Proprietăţile compusului *A* enumerate mai sus îl fac pe Wacker (1963) să conchidă că acesta seamănă cu dimerul timinei şi cu fotoprodusul descris de Rörsch şi colab. (1958).

Prin analogie cu dimerizarea timinei, care a fost bine studiată, dimerizarea uracilului poate fi formulată ca în figura 72.

Iradierea amestecului de timină şi uracil. Analiza cromatografică pe hîrtie a unui amestec de timină-*2*-C^{14} şi uracil-*2*-C^{14}, iradiat de RUV în stare îngheţată, l-a condus pe Wacker (1963) să pună în evidenţă, în afară de dimeri de uracil şi timină, şi prezenţa dimerilor micşti, constituiţi din uracil şi timină. În acest caz, *Rf*-ul dimerului mixt este intermediar faţă de *Rf*-ul celorlalţi doi dimeri. Descompunerea lui este însoţită de punerea în libertate a unei cantităţi echimoleculare de timină şi uracil. Prin urmare, formarea şi descompunerea dimerilor micşti de timină + uracil urmăresc reacţia similară a dimerilor omologi ai timinei şi ai uracilului (fig. 73).

Iradierea acidului citidilic (*Cp*). S-a observat că Cp iradiat cu RUV îşi pierde banda de absorbţie de la 270 mμ, iar simultan apare o nouă bandă de absorbţie la 240 mμ (Sinsheimer, 1957 ; Wang, 1959 ; Wierzchowski şi Shugar, 1961). După părerea ultimilor autori, compusul rezultat (C*p) este produsul de adiţie a unei molecule de apă la dubla legătură $C_5=C_6$ a citozinei. El este instabil, fiind uşor convertit prin păstrarea la temperatura camerei.

Pe de altă parte, Schuster (1964) a arătat că iradierea C*p determină dezaminarea sa, obţinîndu-se U*p. Totodată, Cp poate forma dimeri (Freeman şi colab., 1965).

Utilizînd o tehnică originală pentru analiza produşilor rezultaţi în urma iradierii nucleotidelor pirimidinice, Johns şi colab. (1965) au reuşit să stabilească natura fotoprodusilor acidului citidilic. În prima fază, Cp_3 adiţionează o moleculă de apă şi trece în C^*p_3. Ulterior, C^*p_3 rezultat poate suferi două transformări principale : *a*) prin pierderea unei molecule de apă, în urma căreia se transformă din nou în Cp, sau *b*) elimină o moleculă de amoniac, adiţionînd în acelaşi timp H_2O dă naştere la uracil hidratat (U^*p_3). Schematic fotoprodusii acidului citidilic pot fi astfel reprezentaţi.

$$C_{p_3} \xrightarrow{h\nu} C^*_{p_3} \begin{cases} \xrightarrow{(a)\,-H_2O} C_{p_3} \\ \xrightarrow{(b)} U^*_{p_3} \end{cases}$$

Implicaţiile genetice ale transformării Cp în U*p au fost subliniate de Howard şi Tessman (1964). După ei, aproximativ 60% din mutaţiile induse de RUV la ADN monocatenar al bacteriofagului S_{13} pot fi explicate pe baza tranziţiei C → T. Se presupune că C este convertit în U sau U* (hidrat), care este capabil de a forma legături de hidrogen identice cu T.

După Johns şi colab. (1965) proprietăţile de codificare ale Cp iradiat depind de momentul replicării sistemului iradiat. Astfel, dacă replicarea are loc imediat după iradiere, atunci singura eroare o poate produce numai C*p. În schimb, dacă replicarea se realizează după două ore, atunci aproximativ 8% din C*p este convertit în U*p, iar restul din nou în Cp. În acest caz, U*p va induce alterarea principală a sistemului. În sfîrşit, autorii arată că înlocuirea C cu U are loc în mod principal atunci cînd replicarea are loc după cîteva zile de la iradiere.

Iradierea unor nucleotide şi oligonucleotide. Absorbţia în RUV a soluţiilor apoase de uridină, GpU şi ApA, iradiate cu 7×10^5 ergi/mm² scade cu 86%, 15% şi, respectiv 0%. Prin încălzire la 100° timp de 20 de minute, uridina iradiată îşi creşte absorbanţa cu 33%, iar GpU cu 13%. Reacţia principală pe care o suferă GpU sub influenţa iradierii pare să fie adiţia unei molecule de apă la uracil (Wacker, 1963).

Despre mecanismul reacţiei de dimerizare. Două mecanisme au fost propuse pentru a explica formarea dimerilor dintre bazele pirimidinice ale acizilor nucleici, şi anume unul radicalic şi al doilea ionic.

În favoarea mecanismului radicalic pledează cercetările lui Beukers şi Berends (1960), care au arătat că ionii sau moleculele paramagnetice de Fe^{++}, Mn^{++} etc. inhibă dimerizarea uracilului în soluţie. Pe de o parte, fiind cunoscut modul de acţiune al ionilor paramagnetici asupra stării „triplet", iar pe de altă parte faptul că dimerizarea este accelerată la temperatură joasă, care are o influenţă favorabilă asupra prelungirii stării „triplet", autorii de mai sus susţin mecanismul radicalic de dimerizare. În cazul uracilului, el ar putea fi formulat ca în figura 74.

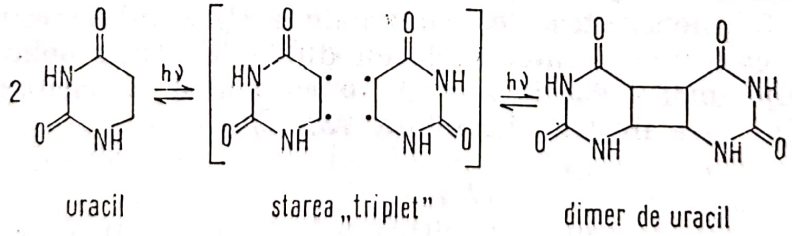


Fig. 74. — Formarea dimerului de uracil prin intermediul unor radicali liberi.

Faptul că dimerul poate fi descompus prin iradiere cu RUV, precum şi lipsa de activitate a ionilor diamagnetici asupra reacţiei reprezintă argumente în plus în favoarea mecanismului radicalic de dimerizare.

Foarte recent, Rahn şi colab. (1965) au demonstrat cu ajutorul unor cercetări realizate prin metoda rezonanţei electronice de spin şi a unor studii de emisiune optică, că RUV induce formarea unor stări „triplet" în ADN. Studiul fosforescenţei timinei în funcţie de pH a arătat că această pirimidină, prin pierderea unui proton din poziţia N_1, prezintă o stare triplet excitată, a cărei fosforescenţă are un timp de descompunere de 0,5 s. Întrucît numai timina devine fosforescentă cînd îşi pierde protonul de la N_1, rezultatele acestea demonstrează existenţa transferului acestui proton de la timină la adenină. Cercetările lui Rahn şi colab. (1965) pot fi considerate ca cele mai demonstrative în favoarea mecanismului radicalic al dimerizării pirimidinelor în cursul iradierii lor cu RUV.

Al doilea mecanism invocat, anume cel ionic, presupune că RUV determină polarizarea dublei legături $C_5=C_6$. S-a observat că substituenţii din C_5 şi C_6 pot influenţa reacţia de dimerizare prin efectul inductiv (+I sau —I), pe care-l au asupra densităţii electronilor de la aceşti doi atomi. Substituenţii atrăgători de electroni (Hlg, NO_2, OH etc. cu efect —I) acţionează negativ asupra dimerizării cînd se găsesc la C_5, în timp ce substituenţii (+I), care măresc densitatea de electroni la C_5, favorizează dimerizarea. Totodată, substituenţii cu efect inductiv —I în poziţia C_6 favorizează dimerizarea. Pe de altă parte s-a observat că grupa NH_2 de la C_4 (cazul citozinei) polarizează mai puţin dubla legătură $C_5 = C_6$ decît grupa carbonilică de la C_4 (cazul uracilului şi timinei). Din această cauză, citozina se dimerizează într-o proporţie foarte mică, iar uracilul şi timina foarte repede.

Toate aceste observaţii îl determină pe Wacker (1963) să susţină că mecanismul dimerizării se bazează pe o reacţie de tip ionic. Admiţînd acest mecanism, reacţia de dimerizare se poate astfel rezuma: RUV determină, printr-o tranziţie de tip N→V, „transferul de sarcină" al legăturii $C_5=C_6$, care devine $C_5^- = C_6^+$. Substituenţii de la C_5 şi C_6 influenţează favorabil sau nefavorabil transferul de sarcină, în funcţie de natura efectului inductiv pe care-l prezintă; dimerizarea este favorizată de substituenţii de la C_5 care prezintă efect +I şi de cei de la C_6 cu efect —I. În acest fel, densitatea electronilor de la C_5 se măreşte, iar cea de la C_6 scade. În continuare, moleculele cu dubla legătură polarizată se dimerizează după mecanismul reacţiei ionice. Cazul particular al dimerizării uracilului este ilustrat în figura 75.

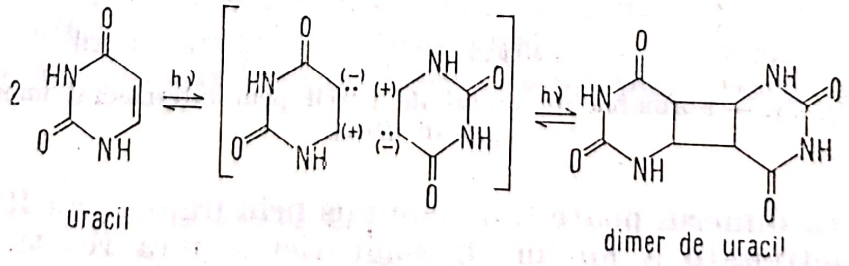


Fig. 75. — Formarea dimerului de uracil printr-o reacţie de tip ionic.

Iradierea acizilor nucleici. Modificările suferite de ADN sub influenţa RUV sînt mult mai bine studiate decît cele suferite de ARN. S-a acordat o mai mare atenţie primilor compuşi datorită rolului lor mai bine conturat în fenomenele de transmitere a caracterelor ereditare.

Multiplele cercetări realizate în acest domeniu au dus la formularea unei ipoteze asupra mecanismului de acţiune a RUV asupra moleculei de ADN, dar este foarte probabil ca RUV să acţioneze şi asupra ARN printr-un mecanism relativ asemănător. Deocamdată însă rezultatele experimentale acumulate în aceste ultime cercetări sînt puţin numeroase pentru a se putea ajunge la o concluzie definitivă. Prin urmare, pentru a ne forma o imagine despre efectele provocate de RUV asupra acizilor ribonucleici, credem că este necesar să prezentăm mai întîi, în mod succint, unele rezultate obţinute cu ADN.

Iradierea ADN. După Marmur şi Grossman (1961), iradierea cu RUV a moleculei de ADN dublu spiralată conduce la unirea mai strînsă a celor două lanţuri. Este evident că ne aflăm în prezenţa formării unor legături covalente între lanţuri. După părerea autorilor citaţi mai sus, legătura nou formată este rezultatul dimerizării dintre lanţuri, adică al formării de dimeri între unităţile de timină situate pe lanţurile opuse ale spiralei duble. Alţi cercetători au constatat că iradierea cu RUV poate produce legături de dimeri între unităţile adiacente de timină din molecula de ADN cu un singur lanţ, fenomen care se presupune că ar avea loc şi între timinele adiacente din ADN nativ. În acest caz, o parte din legăturile de hidrogen dintr-o zonă locală ar trebui să se desfacă înainte de a fi posibilă dimerizarea. Marmur şi Grossman (1961) au precizat că în prima fază iradierea duce la ruperea legăturilor de hidrogen din lanţurile ADN natural.

Cercetările lui Wacker şi colab. (1960 şi 1961 *a*, *b*) au dus la separarea, din acizi nucleici izolaţi din bacterii iradiate cu RUV, a unui compus care este identic cu dimerul timinei, descris de Beukers şi colab. (1958).

Un alt efect al razelor ultraviolete asupra ADN izolat şi care a fost pe deplin dovedit constă în ruperea legăturilor internucleotidice. Acest fenomen se întîmplă însă numai atunci cînd iradierea se face cu doze excesiv de mari de RUV. Dintre reacţiile de sensibilitate, numai transformările citozinei şi timinei sînt cunoscute suficient de bine pentru a putea fi evaluate implicaţiile lor biologice.

Formarea dimerilor de timină în molecula de ADN prezintă o mare importanţă biologică. Pentru replicarea ADN, conform ipotezei acceptate de majoritatea cercetătorilor, legăturile de hidrogen intramoleculare se rup progresiv, dar simultan are loc sinteza lanţurilor noi, complementare, de-a lungul fiecărui lanţ iniţial. O legătură transversală dimerică între lanţuri ar întrerupe separarea, blocînd astfel replicarea. Pe de altă parte, dacă s-ar forma dimerii între timinele adiacente de pe acelaşi lanţ, aceasta ar împiedica posibilitatea de cuplare complementară a bazelor. În mod natural, în molecula iniţială o adenină se situează într-o poziţie

opusă fiecărei timine. Unirea a două timine (dimerizarea) produce, probabil, o modificare suficientă pentru a bloca fie încorporarea adecvată de adenină, fie replicarea, oprind-o brusc la acest punct sau continuînd în mod incorect cu o secvenţă a bazei alterate, pe lanţul nou format. La o replicare ulterioară acest lanţ alterat s-ar replica el însuşi, producînd o moleculă cu secvenţă nouă a bazelor în ambele lanţuri. Se realizează astfel mutaţia.

Cercetări recente au adus noi dovezi experimentale directe ale dimerizării timinei ca bază a alterării activităţii biologice a ADN în urma iradierii cu raze ultraviolete. Astfel, Setlow şi Setlow (1962) urmăresc capacitatea de transmitere a informaţiei genetice a „factorului de transformare" (identic cu ADN), iradiat cu RUV de diferite lungimi de undă şi ajung la unele rezultate interesante. În acest caz, măsura activităţii biologice a ADN ar reprezenta eficacitatea lui de a induce anumite caracteristici în noua celulă. S-a observat că iradierea la 280 mμ afectează capacitatea de „transformare" a unei porţiuni din molecula de ADN. Cînd acest ADN iradiat era expus unei iradiaţii de 240 mμ, o parte din moleculele lui recîştigau capacitatea de a induce transformarea. Experimentatorii au exprimat rezultatele lor cantitativ, susţinînd că aproximativ 50% din inactivitatea ADN se datora dimerizării timinei.

Alături de dimerii de timină, în ultimul timp, s-a descris şi prezenţa dimerilor de citozină şi uracil în unele hidrolizate obţinute din dezoxipolinucleotide naturale sau sintetice iradiate cu RUV.

Dimerii citozinei au fost descrişi de Dellweg şi Wacker (1962) ca produşi rezultaţi în urma iradierii ADN marcat cu citozină-C^{14}. Aceşti dimeri au fost detectaţi sub forma produsului lor de dezaminare — dimerii de uracil.

Setlow şi colab. (1965), cercetînd fotochimia unui complex format între acidul polidezoxiinozinic şi acidul polidezoxicitidilic (dI : dC), au observat, în urma iradierii, formarea dimerilor de citozină, care prin dezaminare au dat naştere la dimeri de uracil. Produsul final al iradierii a fost, prin urmare, dimerul de uracil. În trei solvenţi diferiţi el are aceeaşi mobilitate cromatografică cu dimerul de uracil preparat prin iradierea uracilului îngheţat. Prin iradierea soluţiei, el poate fi transformat în uracil monomer. Cantitatea de dimeri de uracil observată în hidrolizatele acide ale poli-dI : -dC depinde de lungimea de undă, cît şi de doza de iradiere.

Iradierea ARN. În comparaţie cu ADN, cercetările asupra ARN sînt mult mai restrînse. După cum s-a arătat mai sus, datorită compoziţiei asemănătoare a celor doi acizi nucleici, pare normal ca RUV să acţioneze, în ambele cazuri, printr-un mecanism asemănător. Este de aşteptat totuşi ca structurile secundare diferite ale celor doi acizi nucleici să determine o diferenţă în ceea ce priveşte comportarea lor. În acest sens, se poate presupune că moleculele cu o structură secundară bine organizată şi stabilă vor suferi în ansamblu un efect mai slab decît mo-

Scanned with OKEN Scanner

leculele cu o structură secundară mai slab conturată. Într-adevăr, unele rezultate experimentale confirmă acest punct de vedere. O serie de lucrări arată că moleculele de ADN monocatenare sînt mai afectate de RUV decît moleculele aceluiaşi compus, bicatenare, care au configuraţia dublu-elicoidală, stabilizată de legăturile de hidrogen.

În ceea ce priveşte molecula de ARN, aceasta se prezintă în majoritatea cazurilor constituită dintr-un singur lanţ macromolecular, cu un anumit grad de organizare intramoleculară ; este logic să ne aşteptăm ca ea să prezinte modificări rapide şi evidente ale structurii.

Acţiunea RUV asupra acidului ribonucleic infectant. S-a observat că ARN extras din VMT, inactivat în prealabil cu RUV, are viscozitatea intrinsecă identică cu aceea a aceluiaşi produs extras însă din virusul activ (Buzzell, 1959). Se poate deduce din această experienţă că inactivarea virusului are loc fără depolimerizarea concomitentă a acidului nucleic. Prin urmare, şi în acest caz RUV acţionează asupra ARN fără să determine ruperea legăturilor internucleotidice.

Cu toate că ARN extras din virusul poliomielitic are greutatea moleculară şi compoziţia în baze similare cu molecula de ARN din VMT, sensibilitatea lui faţă de RUV este diferită (Norman, 1960). Diferenţele observate se pot datora secvenţei specifice a bazelor în interiorul fiecărui ARN. Astfel, dacă admitem, de exemplu, că RUV induc formarea intramoleculară a unor dimeri de uracil, ARN cu uracili adiacenţi mai numeroşi va fi mai sensibil. Secvenţa bazelor ar putea avea o oarecare influenţă şi asupra celorlalte reacţii induse de RUV în lanţul polinucleotidic.

Este important de notat că energia necesară pentru a inactiva ARN liber, extras din VMT, este mai mică decît aceea care inactivează ARN cuprins în interiorul virusului întreg (tabelul 3).

Tabelul 3

Energia necesară pentru a inactiva VMT şi ARN infectant extras din acelaşi virus (parţial după McLaren şi Takahashi, 1957)

Substanţa	Einsteini/moli	Jouli/mg (inactivare 50 %)
ARN liber	$0{,}33 \times 10^4$	0,43
ARN în VMT	$2{,}1 \times 10^4$	2,8

Din acest tablou rezultă că ARN liber pierde 50 % din activitate la o cantitate de energie (Jouli) de aproximativ 7 ori mai mică decît ARN cuprins în VMT. Nu este nici o îndoială că învelişul proteic al virusului are un rol însemnat în protejarea acidului nucleic. O parte din RUV sînt absorbite de proteină şi numai o cantitate relativ mică ajunge pînă la macromolecula activă pentru a o influenţa.

Scanned with OKEN Scanner

O experienţă deosebit de interesantă realizată de Siegel şi colab. (1956) scoate în evidenţă rolul legăturilor dintre proteină şi acizii nucleici în sensibilizarea acţiunii RUV. Aceşti autori au remarcat că tulpina U_2 a VMT este de 6 ori mai sensibilă la RUV decît tulpina U_1. ARN extraşi din cele două tulpini au prezentat însă acelaşi grad de sensibilitate. Pe de altă parte s-a dovedit că eliberarea proteinei virotice a tulpinei U_2 cu ajutorul metodei lui Fraenkel-Conrat se face mult mai repede decît în cazul tulpinii U_1.

Din aceste constatări s-a ajuns la concluzia că legăturile dintre proteină şi acidul nucleic în cele două tulpini ale VMT fiind diferite, ele influenţează specific sensibilitatea acizilor nucleici faţă de RUV. Stabilitatea legăturilor dintre cele două componente influenţează, într-un sens sau celălalt, acţiunea RUV.

Lozeron şi Gordon (1964) au studiat efectul încorporării 5-fluorouracilului (5-FU) în ARN—VMT. Ei au remarcat că încorporarea acestui constituent sensibilizează atît virusul intact, cît şi ARN infectant al acestui virus la iradierea lor cu RUV. S-a observat că inactivarea virusului normal sau a celui în care s-a încorporat 5-FU este un proces de ordinul întîi. Iradierea la lungimea de undă de 253,7 mμ arată că gradul de sensibilitate a virusului este dependent de cantitatea de analog încorporat. Introducerea 5-FU în proporţie de 20% în ARN determină o sensibilizare detectabilă, în mp ce la o substituţie în proporţie de 50% sensibilitatea devine evidentă. Autorii au observat că în cazul substituţiei de 50% a acidului nucleic sensibilitatea acestuia faţă de RUV este dependentă de lungimea de undă. Creşterea sensibilităţii este progresivă de la 253,7 mμ la 296,7 mμ.

Sensibilitatea mai mare a VMT în care s-a încorporat 5-FU faţă de RUV este asemănătoare cu comportarea bacteriofagului $ØX_{174}$ marcat cu bromuracil. În acest caz, sensibilitatea faţă de iradierea la 297 mμ a fost de trei ori mai mare decît $ØX_{174}$ normal (Denhard şi Sinsheimer, 196)5.

Natura leziunilor provocate de RUV în ARN infectant nu este încă cunoscută. Încercările de a demonstra fotoreactivarea ARN din bacteriofagul M_{12} s-au dovedit a fi ineficace (Winker, 1964). Studiul fotoreactivării ARN—VMT iradiat în RUV a arătat, în schimb, că iradierea la lungimea de undă de 300 mμ conduce la creşterea fotoreactivării acestui acid nucleic, comparativ cu cea observată după iradierea la 253,7 mμ. Mărimea fotoreactivării s-a dovedit a fi independentă de lungimea de undă a iradierii de inactivare în domeniul cuprins între 230 şi 290 mμ în cazul ARN—VMT şi de la 230 pînă la 280 mμ pentru ARN din virusul necrozei tabacului (Merriam şi Gordon, 1965).

Se pune şi în cazul acesta întrebarea: care sînt reacţiile induse de RUV în moleculele de ARN din VMT? După cum s-a arătat mai sus, greutatea moleculară a compusului nu pare să fie modificată. Prin urmare, modificările produse se adresează fie hidratării pirimidinelor, fie dimerizării lor intramoleculare. Dacă adiţia moleculei de apă la $C_5=C_6$, a uracilului sau citozinei, nu ridică probleme practice şi teoretice deosebite, ea fiind fundamentată din ambele puncte de vedere, o dovadă directă a dimerizá-

Scanned with OKEN Scanner

rii nu s-a adus încă. Nu trebuie însă neglijat faptul că, spre deosebire de VMT, acidul său nucleic, o dată inactivat, suferă un efect redus de fotoreactivare (Bawden şi Kleczkowski, 1959). Această observaţie pledează pentru existenţa unor reacţii ireversibile în cursul iradierii, deoarece produsul format este în cea mai mare parte stabil. Datorită faptului că dimerii sînt mai stabili decît produşii de adiţie ai apei, experienţa de fotoreactivare sprijină mai mult ipoteza dimerizării decît pe aceea a adiţiei.

Cercetări asupra acidului poliuridilic (poli-U) şi policitidilic (poli-C). S-a observat că iradierea poli-U cu lumină monocromatică de 2 535 Å determină pierderea proprietăţii sale de a dirija codificarea fenil-alaninei. Introducerea poli-U iradiat într-un sistem acelular de sinteză a proteinelor (sistem preconizat de Nirenberg şi Matthaei, 1961) stimulează încorporarea în proteine a serinei în locul fenil-alaninei (Grossman, 1962). După codul propus de Nirenberg şi colab. (1963) şi Ochoa (1963), fenil-alanina este codificată de tripletul UUU, iar serina de UUC. Dat fiind faptul că uracilul hidratat are o structură mai apropiată de aceea a citozinei decît de dimerul de uracil, modificarea comportării poli-U în urma iradierii este atribuită mai uşor hidratării decît dimerizării (McLaren şi Shugar, 1964).

Importanţa biologică a descoperirii lui Grossman (1962) este deosebită, deoarece ea poate sta la baza explicării unor modificări observate la microorganismele supuse RUV.

Grossman şi Delbruck (1963) au arătat că, în timp ce iradierea cu RUV de 300 mμ a poli-U împiedică capacitatea lui de a codifica fenil-alanina fără să stimuleze încorporarea serinei, iradierea la 250 mμ schimbă proprietatea sa obişnuită de a codifica fenil-alanina în favoarea codificării serinei.

Pe de altă parte, iradierea poli-U, în condiţiile în care predomină produsul de adiţie al apei la dubla legătură $C_5 = C_6$ a uracilului, a determinat ca produsul rezultat să dirijeze includerea atît a serinei, cît şi a fenil-alaninei în proteină (Grossman, 1963).

Utilizînd un sistem de sinteză enzimatică — polimerază ARN dependentă de ARN — Ono şi colab. (1965) au cercetat efectul iradierii cu RUV asupra proprietăţilor de matrice ale poli-C. S-a observat că fotoprodusul rezultat, probabil un hidrat, codifică la fel ca şi U. Tot ei au dovedit că poli-C iradiată cu RUV îşi pierde absorbţia sa caracteristică în UV; prin ridicarea temperaturii ea poate fi redobîndită. De asemenea, s-a remarcat că stimularea încorporării GTP de către poli-C (catalizată de polimeraza ARN) este sensibilă la lumina UV. Modificările rezultate pot fi abolite fie prin deshidratarea produsului iradiat sau prin adăugarea în sistem a ATP.

Iradierea ARN de transfer. Cercetările realizate asupra ARN-*T* izolat din creierul de şoarece ne-au arătat că RUV au o mică influenţă

asupra acestui tip de acid nucleic (Popa şi colab., 1966 *a*, *b*). Spre deosebire de ARN înalt polimerizat din acelaşi ţesut care, în urma iradierii, analizat pe o coloană de AMC prezintă o scădere a maximului curbei de eluţie, ARN-*T*, supus aceluiaşi tratament, îşi măreşte curba de eluţie. Creşterea curbei de eluţie a ARN-*T* iradiat ar putea fi cauzată fie de un efect hipercrom, fie de creşterea randamentului de eluţie al acestor molecule. Întrucît randamentul de eluţie al ARN-*T* este de 100%, creşterea curbei sale de eluţie în urma iradierii trebuie atribuită unui efect hipercrom. Acesta ar putea fi rezultatul eliberării unei grupe cromofore în timpul iradierii. Structura secundară a ARN-*T* fiind oarecum asemănătoare cu aceea a ADN, modificările induse de RUV în cele două modele ar putea fi de natură apropiată.

După cum am mai menţionat, Marmur şi Grossman (1961) au dovedit că RUV conduc într-o primă fază la ruperea legăturilor de hidrogen dintre catenele ARN. În cazul studiat de noi ARN-*T* a fost iradiat perioade de timp variabile, cuprinse între 1 şi 10 minute. Timpul de iradiere fiind scurt, efectul hipercrom observat pe curba de eluţie ar putea fi cauzat la fel ca şi în cazul ADN, de ruperea unor legături de hidrogen din interiorul moleculei de ARN-*T*. Comportarea aceasta pare a fi comună ARN-*T* de diferite origini deoarece atît cel extras din ficatul de şoarece, cît şi din celulele ascitice Ehrlich s-au comportat identic faţă de RUV (Popa şi colab., 1966 *b*).

Modificări parţial reversibile induse în ARN. Shugar şi Wierzchowski (1958) supun ARN comercial extras din drojdie timp de 3 ore la RUV cu intensitate de 5×10 cuante/cm²/min şi observă o scădere de aproximativ 50% a extincţiei măsurată la 260 mμ. Curba caracteristică de absorbţie a ARN iradiat prezintă un maxim de absorbţie foarte turtit. Prin încălzire timp de 5 min la 85°C, compusul iradiat recuperează cei 50% din absorbţia pierdută prin iradiere.

Autorii de mai sus au studiat şi modul de comportare al unui acid apurinic, cu care ocazie au constatat că reversibilitatea modificărilor induse de iradierea acestui compus este mai mică decît în cazul ARN. Pentru a produce acelaşi procent de reversibilitate cu cel obţinut cu ARN, acidul apurinic iradiat trebuie încălzit fie la o temperatură mai ridicată, fie un timp mai îndelungat.

Modificări ireversibile. După toate probabilităţile, modificările ireversibile suferite de ARN sub influenţa RUV se datoresc unor reacţii intramoleculare. Se pune întrebarea naturii acestor reacţii. Scăderea maximului de absorbţie a ARN iradiat, sau chiar dispariţia lui, atunci cînd efectul iradierii este puternic, alături de faptul că transformările suferite de poli-U sînt independente de concentraţie, ar putea fi explicate prin formarea unor dimeri între două molecule de uracil cu ajutorul celor două duble legături $C_5 = C_6$, al ciclului lor. Această interpretare satisface în bună măsură rezultatele experimentale observate. Reamintim cu această ocazie

că dimerii de uracil şi chiar de timină pot fi disociaţi fotochimic, şi, în consecinţă, dimerizarea uracilului şi a timinei este reversibilă. Condiţiile existente în interiorul lanţului polinucleotidic sînt însă mult diferite de cele în care se găsesc dimerii în stare liberă. Din această cauză, este posibil ca energia necesară pentru a disocia dimerii de uracil formaţi în interiorul lanţului polinucleotidic să fie mult mai mare.

Pe de altă parte s-a observat că faza iniţială a fotolizei uracilului include o reacţie ireversibilă, care numai în anumite cazuri devine, sau poate fi parţial, reversibilă (McLaren şi Shugar, 1964).

În sfîrşit s-ar mai putea lua în considerare formarea *5'*-hidro-*6'*-hidroxiderivaţilor uracilului şi citozinei, care în condiţiile lanţului polinucleotidic ar putea şi ei să aibă o stabilitate mult mai mare decît atunci cînd sînt liberi.

Modificări ale structurii secundare şi terţiare a ARN. Cu ocazia studierii acţiunii razelor ultraviolete asupra acidului ribonucleic extras cu fenol din creierul de şoarece normal, Portocală şi colab. (1965) au observat pe curba spectrofotometrică a acestui produs un efect hipocrom datorit iradierii, a cărui intensitate varia în funcţie de timpul de expunere. În majoritatea cazurilor, după 4 minute de iradiere, absorbţia ARN, determinată la 260mμ, scădea cu aproximativ 30% faţă de valoarea înregistrată înainte de iradiere (fig. 76).

Întrucît cromatografia pe coloană poate oferi informaţii asupra greutăţii moleculare şi structurii secundare a moleculelor de ARN (Mandel şi Hershey, 1960; Hershey şi Burgi, 1960; Goldthwait şi Kerr, 1962 etc.), Portocală şi colab. (1965) au întrebuinţat această metodă pentru a analiza modificările ARN iradiat cu RUV*.

Pentru acest scop s-au realizat cromatografii pe coloane cu albumină metilată adsorbită pe celită (AMC) şi pe coloane de DEAE-celuloză (Portocală şi Popa, 1964).

Figura 77 reprezintă, pentru comparare, curbele de eluţie de pe albumina metilată a 450 μg de ARN proaspăt extras şi a unei cantităţi egale din acelaşi compus, după iradiere timp de 4 minute.

Din aceste curbe rezultă că ARN expus RUV prezintă valori ale extincţiei în general mai scăzute decît ale aceluiaşi acid în stare nativă. Media recuperării de pe coloane de AMC a ARN iradiat faţă de cantitatea introdusă în coloană a fost de 97 ± 1%, ceea ce arată că întreaga cantitate a fost practic eluată.

Totodată, pe figura 77 se observă că fracţiunile probei iradiate se eluează la molarităţi identice de NaCl, la care se eluează şi fracţiunile de ARN nativ. Aceste observaţii ne-au permis să afirmăm că, în cazul studiat, RUV nu au modificat greutatea moleculară a produsului, deoarece

* Pentru aceste cercetări, iradierea a fost făcută cu o lampă de RUV VEB (K) Thellta Zella-Mehlis de 450 waţi la o distanţă de 25 cm. Preparatele au fost ţinute pe gheaţă în timpul iradierii pentru a evita efectul termic denaturant.

din ambele produse moleculele de ARN cu greutăţi moleculare identice sînt eluate de pe coloana de albumină metilată la aceeaşi concentraţie de NaCl.

Figura 78 reprezintă curbele de eluţie a 450 μg de ARN, cromatografiat pe coloană de DEAE-celuloză imediat după extracţie, şi a aceleiaşi cantităţi după iradiere timp de 4 minute.

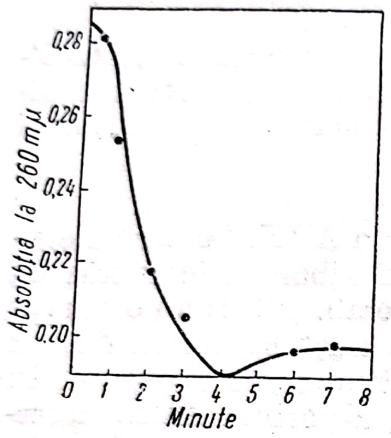


Fig. 76. — Variaţia absorbţiei la 260 mμ a acidului ribonucleic extras din creierul de şoarece şi supus RUV, perioade de timp variabile (după Portocală şi colab., 1965).

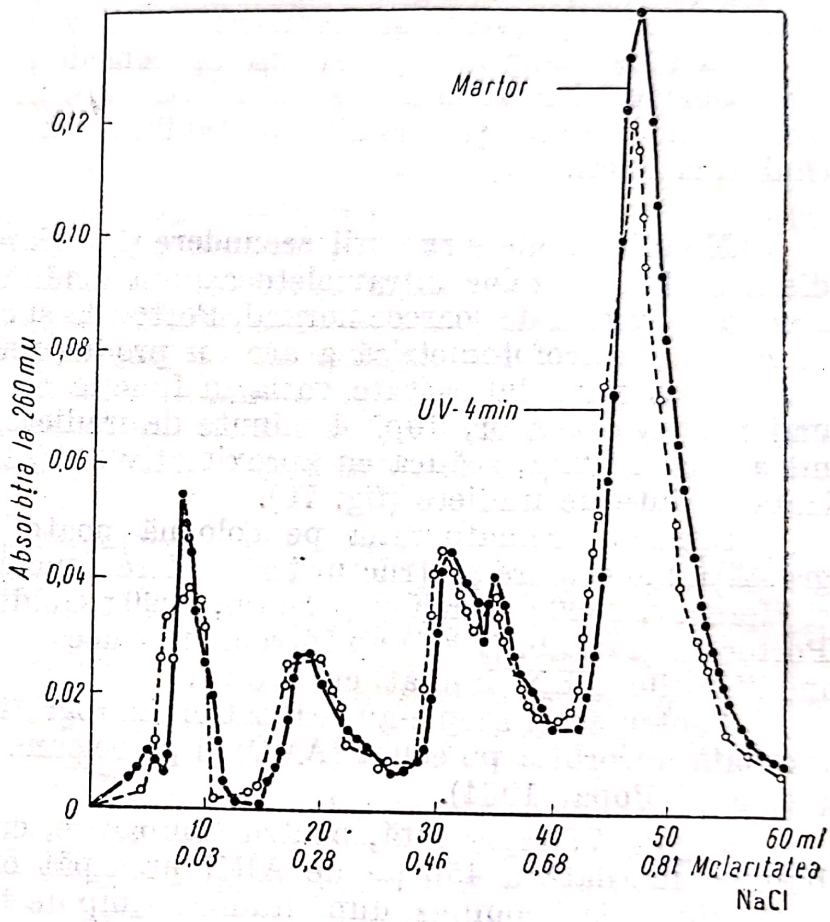


Fig. 77. — Cromatografia pe coloană de albumină metilată. Curba de eluţie a 450 μg de ARN iradiat 4 min cu RUV şi a aceleiaşi cantităţi neiradiate (după Portocală şi colab., 1965).

Se observă că în această experienţă proba iradiată se eluează în proporţie mai mică de pe DEAE-celuloză. Astfel, recuperările de pe DEAE-celuloză a ARN iradiat faţă de cantitatea introdusă în coloană este de numai 60 ± 3%. Aceasta demonstrează că aproximativ 40% din moleculele de ARN iradiate sînt reţinute pe DEAE-celuloză şi nu se mai eluează la gradienţii de NaCl utilizaţi. Absorbţia la 260 mμ a ARN iradiat şi eluat de pe DEAE-celuloză este de numai 35 ± 1% din aceea a compusului nativ eluat de pe aceeaşi coloană.

Randamentul scăzut al eluţiei moleculelor de ARN iradiate de pe DEAE-celuloză se datoreşte, după toate probabilităţile, modificării structurii moleculare, ceea ce îi conferă o afinitate crescută faţă de acest anionit.

După părerea noastră hipocromicitatea globală a ARN ca şi scăderea randamentului eluţiei de pe DEAE-celuloză pot fi explicate prin modificarea structurii secundare şi terţiare a moleculelor determinată de iradierea cu RUV.

Dat fiind că sub influenţa RUV formarea dimerilor stabili ai uracilului şi, într-o proporţie mai mică, cei ai citozinei a fost demonstrată,

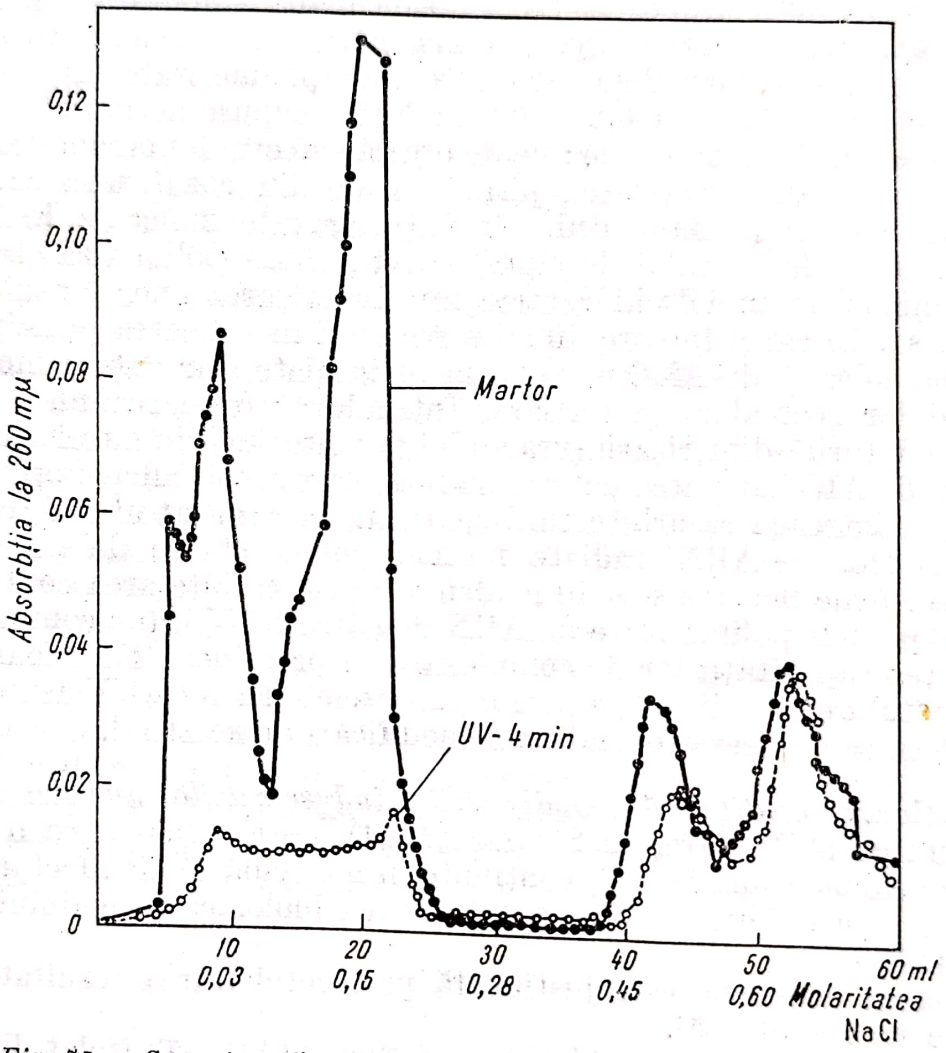


Fig. 78. — Cromatografia pe coloană de DEAE-celuloză. Curba de eluţie a 450 μg de ARN iradiat 4 min cu RUV şi a aceleiaşi cantităţi neiradiate (după Portocală şi colab., 1965).

efectele observate se pot datora formării acestor tipuri de dimeri intramoleculari, asemănători celor ai timinei, evidenţiaţi în cazul moleculei de ADN (Wacker şi colab., 1960). Totodată, adiţia unei molecule de apă la dubla legătură $C_5 = C_6$ a uracilului sau citozinei, reacţie fotochimică descrisă sub acţiunea RUV de Sinsheimer şi Hastings (1949), poate şi ea influenţa mărimea efectelor observate.

În continuarea cercetărilor noastre consacrate cunoaşterii modificărilor structurale induse de RUV în moleculele de ARN am studiat, tot prin metoda cromatografică pe coloană, influenţa iradierii asupra ARN—P^{32} extras din celulele tumorii ascitice Ehrlich (Popa şi colab., 1966 *a*, *b*).

Studiile realizate cu acest acid nucleic marcat au arătat că moleculele înalt polimerizate de ARN supuse acţiunii RUV îşi pierd parţial şi capacitatea de a se elua de pe coloană. Cu cît timpul de iradiere este mai îndelungat, cu atît proporţia moleculelor înalt polimerizate rămase pe coloană în urma cromatografiei este mai mare. Prin urmare, în scăderea curbei de eluţie a moleculelor de ARN înalt polimerizate (nu se eluează de pe coloana de AMC la 0,8 — 0,9 m NaCl) supuse acţiunii RUV, sînt implicate cel puţin două cauze : pe de o parte efectul hipocrom determinat de hidratarea sau dimerizarea pirimidinelor din constituţia sa, iar pe de alta de scăderea randamentului de eluţie a acestei molecule. Este posibil ca scăderea randamentului de eluţie al ARN înalt polimerizat iradiat să fie determinată tocmai de hidratarea sau dimerizarea unor pirimidine din molecula sa. În cazul în care dimerizarea ar fi modificarea principală, reţinerea pe coloană de AMC a moleculelor iradiate s-ar datora modificării structurii lor secundare şi terţiare. Într-adevăr formarea unor legături covalente datorită dimerizării (uracilului sau citozinei) în interiorul macromoleculei de ARN ar putea determina înreţelarea moleculei şi prin aceasta să schimbe întreaga sa arhitectură spaţială. Ca rezultat al acestei schimbări, moleculele de ARN iradiate nu mai pot fi eluate de pe coloană.

Cercetările noastre scot în evidenţă faptul că alterarea configuraţiei moleculelor înalt polimerizate de ARN de către RUV este acompaniată şi de creşterea capacităţii lor de complexare cu proteinele. Este foarte posibil ca efectul de inactivare pe care îl au dozele mici de RUV asupra ARN infectant să se datoreze tocmai unor modificări de acest fel.

Evaluarea cantitativă a modificărilor induse acizilor nucleici de RUV. După cum arată McLaren şi Shugar (1964), este suficient ca o singură bază din cele 200 pînă la 400, conţinute în moleculă să fie afectată de un agent fizic sau chimic pentru ca activitatea biologică a acidului nucleic să se modifice.

Această concluzie este justificată prin coroborarea rezultatelor obţinute pe mai multe căi.

Astfel, s-a observat că ADN transformant (ADN-*T*) izolat din pneumococ şi inactivat prin iradiere în proporţie de 90% prezintă scăderea punctului său de topire mijlociu (Tm) cu 1°5 C, ceea ce corespunde cu ruperea unui număr mic de legături de hidrogen. Cunoscînd, în primul rînd, faptul că o pereche de adenină şi timină (A — T) formează două legături de hidrogen, iar guanina şi citozina (G — C) trei legături de hidrogen şi, în al doilea rînd, că scăderea cu 1°C a Tm corespunde desfacerii a două legături de hidrogen la 200 de baze, scăderea Tm cu 1°5 C a ADN-*T* din pneumococ inactivat 90% se datoreşte desfacerii a trei legături de hidrogen la fiecare 200 de baze.

Scanned with OKEN Scanner

Din acest calcul aproximativ autorii citaţi deduc că pierderea capacităţii de transformare a ADN este însoţită de modificarea a 1—2 baze dintr-o sută.

Valoarea obţinută, cu toată aproximaţia ei, ne oferă totuşi o imagine asupra ordinului de mărime a alterărilor provocate de RUV, cu implicaţii în pierderea activităţii biologice a acizilor nucleici.

La rezultate asemănătoare s-a ajuns şi din studiul mutaţiilor bacteriofagului T_4, induse prin reacţii chimice sau metabolice cu omologii bazelor, cînd s-a observat că fiecare mutaţie este provocată de modificarea unui număr mic de baze care probabil se rezumă la o singură pereche (Freese, 1959).

Rezultatele prezentate permit să se ajungă la unele concluzii asupra acţiunii RUV faţă de ARN şi a componentelor lor. Astfel, s-a observat că dozele mici de RUV *nu produc*:

a) ruperea lanţului internucleotidic,

b) modificarea apreciabilă a greutăţii moleculare a acizilor nucleici,

c) modificări evidente ale ribozei şi a purinelor.

În schimb, s-a pus în evidenţă că:

a) dintre pirimidine, citozina şi uracilul suferă în primul rînd o reacţie de adiţie a unei molecule de apă, formîndu-se *5*-hidro-*6*-hidroxiderivatul corespunzător, compus care prin încălzire eliberează apa adiţionată;

b) citozina, într-o măsură mai mică, iar timina şi uracilul, într-o proporţie mai mare, se pot dimeriza;

c) în moleculele bicatenare ale ADN, RUV induc formarea unor legături transversale între lanţuri, care se datoresc dimerilor de timină şi citozină; natura modificărilor suferite de acidul ribonucleic nu este încă satisfăcător stabilită; în acest din urmă caz este posibilă atît adiţia apei la dubla legătură $C_5=C_6$ din ciclul pirimidinelor, cît şi, eventual, o dimerizare a moleculelor de uracil sau citozină adiacente din lanţul polinucleotidic;

d) este suficient ca 1—2 din o sută de baze ale acidului nucleic, biologic activ, să fie modificate pentru ca activitatea lui să fie abolită.

Bawden F. C., Kleczkowski A. (1959), Nature, **183**, 503.
Beukers R., Ijlstra J., Berends W. (1958), Rec. trav. chim., **77**, 729.
Beukers R., Berends W. (1960), Biochim. biophys. Acta, **41**, 550.
Beukers R., Berends W. (1961), Biochim. biophys. Acta, **49**, 181.
Blanck C. H., Arnold W. (1935), J. Bacteriol,. **30**, 503.
Boedtker H. (1961), J. mol. Biol., **2**, 171.
Bowen G. H. (1953), Ann. Inst. Pasteur, **84**, 218.
Brown G. L. (1963), în *Progress in nucleic acids research*, sub red. J. N. Davidson, W. E. Cohn, Academic Press, New York, vol. II, p. 260.
Buzzel A. (1959), (citat după McLaren şi Shugar, 1964).
Cavalieri L. F., Bendich A., Timker J. F. (1948), J. amer. chem. Soc., **70**, 3 875.

Chargaff E., Zamenhof S. (1948), J. biol. Chem., **173** 327.
Cox R. A., Littauer U. Z. (1960), J. mol. Biol., **2**, 166.
Currau H. K., Evans F. R. (1938), J. Bacteriol., **36**, 455.
De Garilhe M. P., Laskowski M. J. (1959), J. biol. Chem., **223**, 661.
Dellweg H., Wacker A. (1962), Naturforsch., **17b**, 827.
Denhard D., Sinsheimer R. (1965), J. mol. Biol., **12**, 674.
Doty P., Boedtker H., Fresco J. R., Haselkorn R., Litt M. (1959), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **35**, 782.
Doty P., Boedtker H., Fresco J. R., Holl B. D., Haselkorn R. (1959), Ann. N.Y. Acad. Sci., **81**, 693.
Freeman K. B., Hariharan P. V., Johns H. E. (1965), J. mol. Biol., **13**, 833.
Freese (1959) (citat după McLaren și Shugar, 1964).
Gates F. L. (1929), J. gen. Physiol., **13**, 249.
Grossman L. (1962), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **48**, 1 609.
Grossman L. (1963), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **50**, 657.
Grossman L., Delbruck M. (1963), Fed. Proc., **22**, 2 526.
Holdthwait G. A., Kerr D. C. (1962), Biochim. biophys. Acta, **61**, 930.
Hanawalt P., Setlow R. (1960), Biochim. biophys. Acta, **41**, 283.
Haward B. D., Tessman I. (1964), J. mol. Biol., **9**, 372.
Henri V. (1914), C. R. Acad. Sci., **158**, 1 032.
Hershey A. D., Burgi E. (1960), J. mol. Biol., **2**, 143.
Janon C., Shugar D. (1960), Acta Biochim. Polon., **7**, 309.
Johns H. E., Le Blanc I. C., Freeman K. B. (1965), J. mol. Biol., **13**, 849.
Kay E. R., Dounce A. L., (1953), J. amer. chem. Soc., **75**, 4 041.
Kunitz M. (1946), J. biol. Chem., **164**, 563.
Lawley P. O., Brookes P. (1962), J. mol. Biol., **4**, 216.
Lozerron H., Gordon M. (1964), Biochemistry, **3**, 507.
Magasanik B., Chargaff E. (1951), Biochim. biophys. Acta, **7**, 396.
Mahler H. R., Da Silva-Pereira A. (1962), J. mol. Biol., **5**. 325.
Mandel I. D., Hershey A. D. (1960), Anal. Biochem., **1**, 66.
Marmur J., Grossman L. (1961), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **47**, 778.
McLaren A. D., Takahashi W. N. (1957), Rad. Res., **6**. 532.
McLaren A. D., Shugar D. (1964), *Photochemistry of proteins and nucleic acids*, Pergamon Press, New York.
Merriam V., Gordon M. (1965), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **54**, 1 261.
Michelson A. M. (1958), Nature, **182**, 502.
Michelson A. M. (1963), *The chemistry of nucleosides and nucleotides*, Academic Press, New York.
Moore A. M., Thomson C. H. (1955), Science, **122**, 594.
Nirenberg M. W., Matthaei J. H., (1961), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **47**, 1 588.
Nirenberg M. W., Matthaei J. H., Jones O. W., Martin R. G., Barondes S. H. (1963), Fed. Proc., **22**, 55.
Norman A. (1960), Virology, **10**, 384.
Ochoa S. (1961), Fed. Proc., **22**, 80.
Ono I., Wilson R., Grossman L. (1965), J. mol. Biol., **11**, 600.
Popa L., Cruceanu A., Portocală R. (1966 *a*), Primul Simpozion de biofizică și biochimie, Sofia (sub tipar).
Popa L., Cruceanu A., Portocală R. (1966 *b*), A treia conferință republicană de chimie, Timișoara (sub tipar).
Portocală R., Popa L., Samuel I. (1963), St. cerc. inframicrobiol., **6**, 697.
Portocală R., Popa L. (1964), St. cerc. biochim., **3**, 337.
Portocală R., Popa L., Samuel I. (1965), Biochim. biophys. Acta, **95**, 185.
Rahn P. O., Schulman R. G., Zangworth (1965), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **53**, 893.
Rörsch A., Benkers J., Ijlstra I., Berends W. (1958), Rec. trav. chim., **77**, 423.
Schuster H. (1964), Naturforsch., **19 b**, 815.
Setlow R., Setlow J. (1962), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **48**, 1 250.
Setlow R., Carrier W., Bollum F. (1965), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **53**, 1 111.
Shugar D., Wierzchowski K. L. (1957), Biochim. biophys. Acta, **23**, 657.

Scanned with OKEN Scanner

Shugar D., Wierzchowski K. L. (1958), Post. Biochemii, *4*, supl., 243.
Sinsheimer K. Z., Hastings R. (1949), Science, **110**, 525.
Sinsheimer K. Z. (1957), Rad. Res., **6**, 121.
Siegel A. W., Wildman S. G., Ginoza W. (1956), Nature, **178**, 1 117.
Spirin A. S. (1962), *Acides ribonucléiques et polyphosphates*, C.N.R.S., Paris, p. 73.
Tsuboi K. K. (1950), Biochim. biophys. Acta, **6**, 202.
Tsuboi K. K., Stowel R. E. (1950), Biochim. biophys. Acta, **6**, 192.
Wacker A., Dellweg H., Weinblum D. (1960), Naturwissenschaften, **20**, 477.
Wacker A., Weinblum D., Träger L., Moustafa Z. A. (1961 *a*), J. mol. Biol., **3**, 790.
Wacker A., Dellweg H., Ledermann E. (1961 *b*), Ann. Chem., **73**, 64.
Wacker A. (1963), în *Progress in nucleic acids research*, Academic Press, New York, vol. I, p. 369.
Wallace J. M., Ts'o P. O. P. (1961), Biochem. biophys. Res. Comm., **5**, 125.
Wang S. Y. (1959), Nature, **184**, 184.
Weinblum D. (1961), Teză de doctorat. Technische Universität, Berlin.
Wierzchowski K. L., Shugar D. (1960), Acta Biochim. Polon., **7**, 377.
Wierzchowski K., L. Shugar D. (1961), Acta Biochem. Polon., **8**, 219.
Winkler U. (1964), Photochem. Photobiol., **3**, 37.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 4

REACȚIA ACIZILOR RIBONUCLEICI CU AGENȚII CHIMICI

Reacția cu hidroxil-amina

Schuster (1961) a fost primul autor care a dovedit că ARN din VMT își pierde activitatea infectantă dacă este tratat cu această substanță. Întrebuințarea NH_2OH ca agent mutagen a fost inițiată de acest autor și în același timp de Freese și colab. (1961). S-a observat că incubarea ARN sau ADN cu NH_2OH nu duce la scăderea vîscozității sau a greutății moleculare a acestor polimeri (Schuster, 1961).

Recent Tessman și colab. (1964) au demonstrat specificitatea absolută a acestui reactiv pentru rezidiile citozinice. Zilling și colab. (1962) au studiat acțiunea NH_2OH asupra ARN-ribozomal izolat cu fenol din *E. coli*. Reacția a fost urmărită la două valori ale pH-ului (10 și 6), după care ARN a fost precipitat la rece cu $HClO_4$ și apoi hidrolizat cu KOH. Mononucleotidele rezultate au fost separate prin electroforeză pe hîrtie și extincția lor măsurată după eluție. În altă serie de experiențe, probele precipitate au fost hidrolizate cu RN-ază, iar produsele obținute fracționate prin electroforeză în gel de Sephadex G-75; s-au înregistrat următoarele rezultate:

a) La pH 10, viteza de reacție a NH_2OH cu ARN este mai mică decît cu unele mononucleotide, probabil, după cum susțin autorii, datorită influenței structurii secundare a ARN.

b) În hidrolizatul alcalin al ARN, tratat cu NH_2OH, acidul uridilic este degradat 100%, iar acidul citidilic numai 20%. Pe de altă parte, în hidrolizatul enzimatic scade cantitatea oligonucleotidelor care conțin UMP și a mononucleotidelor citidilice, în timp ce UMP nu a putut fi pus în evidență. Din rezultatul ultimelor observații, s-a ajuns la concluzia că ribonucleaza nu a scindat lanțul polinucleotidic în dreptul nucleotidelor uridilice.

c) La pH 6, după hidroliza enzimatică nu s-a putut pune în evidență CMP liber, ceea ce se datorește faptului că formarea aductului hidroxilamină — acid citidilic a modificat acțiunea ribonucleazei. În același timp, hidroliza alcalină a dovedit prezența acidului citidilic în cantitate neschim-

Scanned with OKEN Scanner

bată, ceea ce s-a atribuit reacţiei de reconversiune pe care o suferă acidul *6*-hidroxil-amino-*1*, *6*-dihidrocitidilic, format în prima etapă, în acid citidilic.

Aceste rezultate au demonstrat că există posibilitatea de a modifica selectiv unele mononucleotide ale lanţului polinucleotidic. Importanţa acestor reacţii este deosebită, deoarece ele oferă posibilitatea de a se obţine informaţii despre secvenţa nucleotidelor din interiorul macromoleculei şi asupra mecanismului de acţiune a unor enzime. O altă perspectivă pe care o deschide reacţia NH_2OH cu acizii nucleici este aceea a cunoaşterii unor aspecte ale mutagenezei.

Efectul mutagen şi inactivant al NH_2OH asupra ARN din VMT a fost studiat de Schuster şi Wittmann (1963). Ei au observat că reacţia urmează o cinetică de ordinul I la pH 6,1 şi 9,1. Este important de subliniat că tratamentul cu NH_2OH 1M, la pH 6,1 (alterarea citozinei) a condus la mutaţii, în timp ce acelaşi tratament la pH 9,1 (alterarea uracilului) pare să aibă numai un efect inactivant. Virusul intact este rezistent la acţiunea NH_2OH.

Reacţia hidroxil-aminei cu unele componente ale ARN. Cercetările lui Schuster (1961), Zilling şi colab. (1962) şi Brown şi Schell (1965) au condus la cunoaşterea mecanismului de acţiune a hidroxilaminei asupra unor componente ale ARN.

Cu ocazia acestor lucrări s-a observat că reacţia nucleotidelor pirimidinice ale ARN cu NH_2OH este dependentă de pH. În condiţii similare,

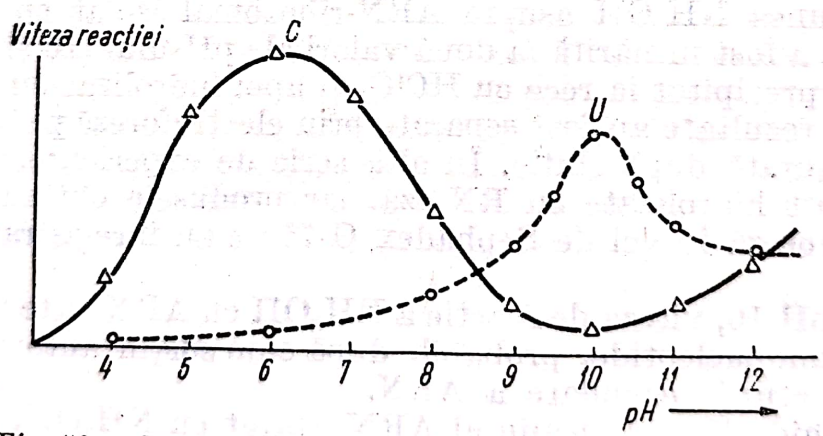


Fig. 79. — Viteza reacţiei acidului citidilic (*C*) cu hidroxilamina este optimă la pH 6,1, în timp ce a acidului uridilic (*U*) la pH 10 (după Zilling şi colab., 1962).

derivaţii adeninei nu reacţionează în timp ce guanina şi derivaţii ei reacţionează foarte încet.

Nucleozidele şi nucleotidele uracilului şi citozinei sînt atacate repede, iar uracilul liber nu prezintă o reacţie detectabilă. Reacţia optimă cu acidul uridilic se produce la pH 10, iar pentru acidul citidilic la pH 6,1 (fig. 79). După cum se poate remarca din aceste curbe, există posibilitatea de a degrada selectiv acidul citidilic sau acidul uridilic, controlînd pH-ul. Pe de

o parte, faptul că la pH 10 acidul citidilic reacționează încă într-o măsură apreciabilă, iar pe de altă parte că acest pH determină o slabă hidroliză a lanțurilor polinucleotidice, aplicarea acestei reacții în cazul acidului ribonucleic este într-o oarecare măsură limitată.

Reacția NH_2OH cu acidul uridilic sau uridina. Zilling și colab. (1962) au observat că viteza de reacție a acestor compuși este direct proporțională cu concentrația hidroxil-aminei. Produșii reacției au fost : ureea, ribozo-oxima sau fosfații lor și o substanță care prezintă o puternică absorbție în RUV.

Ureea și ribozo-oxima au fost identificate prin compararea comportării lor cromatografice și electroforetice cu soluții standard. Ulterior, substanța necunoscută a fost identificată ca fiind *5*-izoxalonă. Reacția dintre NH_2OH și acidul uridilic formulată de autorii citați mai sus constă în atacul nucleofilic al azotului hidroxil-aminei asupra carbonului *4'*

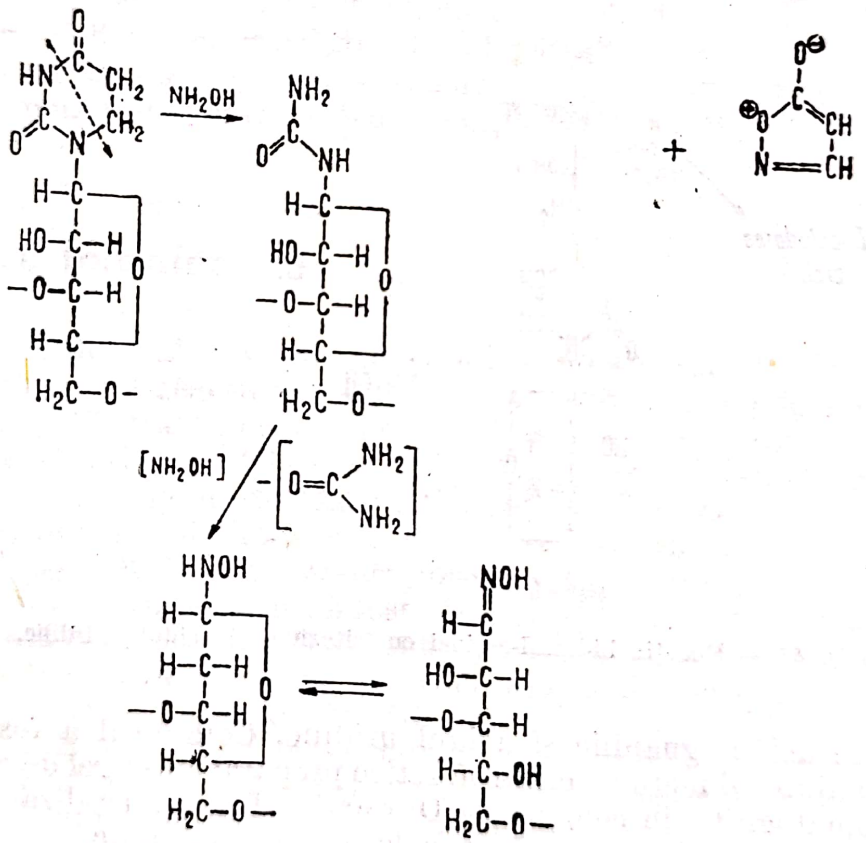


Fig. 80. — Reacția hidroxil-aminei cu uridina sau acidul uridilic (după Zilling și colab., 1962)

electrofil sau al oxigenului carbonului *6'*, urmat de o ciclizare și formarea *5*-izoxalonei și eliminarea ribozid-ureei sau fosfatului ei. Ureea este eliberată ulterior din ribozid-uree de către o nouă moleculă de hidroxil-amină (fig. 80).

Scanned with OKEN Scanner

Reacţia NH_2OH cu acidul citidilic, citidina şi poli-C. La pH 6,0 acidul citidilic îşi pierde complet extincţia în RUV după o perioadă de timp de 90 de minute. Totuşi, separarea electroforetică la pH 3,5 a produsului obţinut conduce la obţinerea unei benzi ce absoarbe puternic în UV,

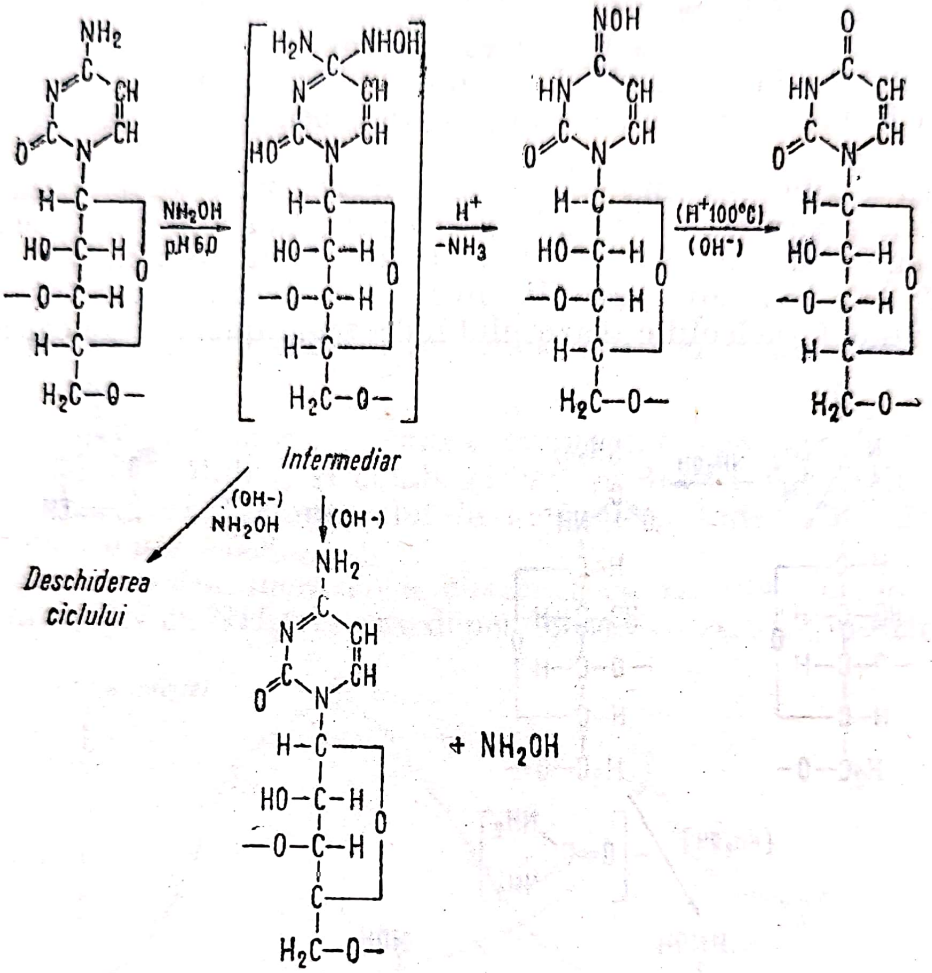


Fig. 81. — Reacţia hidroxil-aminei cu citozina şi acidul citidilic.

situată între acidul guanilic şi acidul uridilic. Compusul a fost ulterior izolat fie cu ajutorul metodei electroforetice preparative în gel de Sephadex, fie prin cromatografie în coloană de Dowex-50. După cristalizare, această substanţă a putut fi identificată cu acidul uridil-*6*-oximic.

Dispariţia absorbţiei în RUV, la pH 6,0, demonstrează că în prima etapă s-a sintetizat o altă substanţă şi că acidul uridil-*6*-oximic, izolat prin electroforeză şi cromatografie, este un produs secundar al reacţiei. Intermediarul a putut fi parţial purificat, prin electroforeză la pH 6,0, şi a fost convertit cantitativ în acid uridil-*6*-oximic prin incubarea sa în HCl N/10 timp de cîteva minute într-o baie de apă care fierbe.

În prezenţa excesului de NH_2OH şi la un pH acid, intermediarul este apoi degradat, probabil printr-un mecanism similar cu cel descris la acidul uridilic.

Este interesant de constatat că prin tratament alcalin produsul intermediar este reconvertit în acid citidilic.

Formarea intermediarului şi a produşilor finali ai reacţiei dintre NH_2OH cu acidul citidilic sau cu citozina este explicată de Zilling şi colab. (1962) prin reacţiile reprezentate în figura 81.

Creşterea vitezei de reacţie spre valorile acide de pH demonstrează că citidina sau acidul citidilic reacţionează sub formă cationică. Structura intermediarului prezentată în figura 81 se bazează pe două constatări : *a*) analiza conţinutului său în fosfor şi azot a arătat raportul 1 : 3 393 ; *b*) în timpul conversiei sale în oximă s-a putut pune în evidenţă degajarea NH_3.

Reacţia hidroxil-aminei cu poli-C a fost studiată de Brown şi Phillips (1965). Ei au remarcat formarea acidului N_6 — hidroxicitidilic, ca produs final al reacţiei. În prima etapă produsul reacţiei este constituit din *4*-hidroxil-amino-*4,5*-dihidrocitozine. Acestea din urmă sînt considerate a fi responsabile pentru erorile de replicare în mutageneza cu NH_2OH.

Reacţia cu formaldehida

Cercetările realizate de Zamenhof şi colab. (1953) au demonstrat că ADN nativ nu reacţionează cu formaldehida 1,3 % ; în schimb ARN extras din VMT tratat cu aceeaşi cantitate de formaldehidă îşi măreşte spectrul de absorbţie la 260 mμ. Totodată, maximul său de absorbţie se deplasează spre lungimi de undă mai mari cu 3—5 mμ (Fraenkel-Conrat, 1954). O modificare similară suferă şi moleculele de ADN monocatenare izolate din fagul ΦX_{174} în prezenţa formaldehidei (Sinsheimer, 1959).

Deosebit de importantă a fost observaţia făcută de Sarkar şi Dounce (1961) asupra comportării ADN din timusul de viţel în comparaţie cu ARN extras din ficatul de şobolan. În urma analizelor spectrofotometrice, s-a constatat că acest ADN, denaturat prin încălzire, astfel încît cele două catene ale sale să devină independente, a reacţionat cu formaldehida în acelaşi mod ca şi ARN. S-a dedus din această experienţă că formaldehida reacţionează numai cu moleculele acizilor nucleici care au grupări aminice neangajate în legături de hidrogen.

Numeroase publicaţii, care au apărut în acelaşi timp sau după lucrarea de mai sus, au arătat că formaldehida poate avea, în funcţie de concentraţie, o acţiune de denaturare asupra acizilor nucleici (Grossman şi colab., 1961 ; Berns şi Thomas, 1961 ; Haselkorn şi Doty, 1961). Studiile cinetice realizate cu această ocazie au demonstrat că acţiunea formaldehidei asupra polinucleotidelor cu un anumit grad de organi-

Scanned with OKEN Scanner

zare intramoleculară se manifestă în două etape: în prima are loc denaturarea, iar în a doua reacţia formaldehidei cu grupele aminice libere.

Denaturarea s-a putut dovedi prin determinarea temperaturii de tranziţie a unor acizi nucleici trataţi cu diferite concentraţii de formaldehidă. Haselkorn şi Doty (1961) au stabilit că, fiecare gram de formaldehidă adăugată la 100 ml de soluţie scade cu aproximativ 18°C temperatura de tranziţie a helixului de acid poliriboinozinic. Aceiaşi autori au arătat că reacţia cu formaldehidă poate fi întrebuinţată pentru determinarea grupelor aminice libere ale acizilor nucleici. Reacţia are loc atît la temperaturi joase cît şi la cele ridicate în prezenţa unei concentraţii relativ scăzute de formaldehidă. Din datele spectrale ale produsului reacţiei cu formaldehidă la diferite temperaturi, se pot obţine informaţii asupra conformaţiei native (helix) şi denaturate (ghem) a acidului nucleic.

Valorile spectrale corespunzătoare, în absenţa formaldehidei, dau toate datele necesare pentru a calcula proporţia de grupe aminice libere ale citozinei şi adeninei, accesibile formaldehidei. Cele inaccesibile reprezintă fracţiunea din molecula de acid nucleic angajată în regiuni ordonate elicoidal, cu ajutorul legăturilor de hidrogen.

Tabelul 4

Datele spectrale pentru determinarea grupelor aminice libere ale acizilor nucleici prin metoda Haselkorn şi Doty (1961)

Lungimea de undă	Absorbanţa relativă				
	Timpul zero 22°C (helix)	10 min 90°C (ghem)	110 ore plus HCHO (helix plus HCHO)	10 min plus HCHO (80°C) (ghem plus HCHO)	Fracţiunea corectată a grupelor aminice libere (la sută)
mμ	(1)	(2)	(3)	(4)	(5) = (3) − (1)/(4) − (2)
245	0,800	0,980	0,820	1,020	0,1 denaturare
270	0,880	1,100	1,045	1,300	82
275	0,760	0,900	0,910	1,100	75
280	0,600	0,690	0,730	0,880	68
285	0,420	0,475	0,530	0,610	67
					Media = 73

În tabelul 4 prezentăm după Mahler şi da Silva Pereira (1962) un exemplu de întrebuinţare a formaldehidei 0,48% pentru determinarea grupelor aminice libere a unui acid nucleic monocatenar, cu ajutorul metodei lui Haselkorn şi Doty (1961). Din aceste rezultate s-a ajuns la concluzia că, în aceste condiţii, formaldehida a determinat o denaturare nesemnificativă (<10%) şi că 0,73 ± 0,07 din toate grupele aminice ale adeninelor şi citozinelor sînt libere în conformaţia nativă şi numai 0,3 din acestea sînt situate în regiunile angajate în legături de hidrogen ale polimerului.

Scanned with OKEN Scanner

Aplicînd aceeaşi metodă am reuşit să stabilim că în ARN înalt polimerizat din ficatul şi creierul de şoarece fracţiunea grupelor aminice libere este de aproximativ 0,6 (Popa şi colab., 1966 *a*, *b*).

Ca urmare a reacţiei formaldehidei 0,48% cu polinucleotidele, am reuşit să punem la punct o metodă de determinare a temperaturii de tranziţie a acizilor nucleici (Popa şi Portocală, 1965). Rezultatele obţinute sînt asemănătoare cu cele descrise în literatură şi obţinute prin întrebuinţarea unui echipament special de termostatare (vezi pagina 40).

Feldman (1965), prin urmărirea produşilor hidrolizei alcaline a ARN tratat cu formaldehidă 0,2 M, timp de 20 de zile la temperatura camerei şi la pH 4,8, a reuşit să pună în evidenţă un produs de condensare a adenozinei cu formaldehida. Acesta a fost identificat graţie caracteristicilor sale cromatografice şi spectrofotometrice, ca fiind metilen-*bis*-adenozină. ARN tratat cu formaldehidă marcată cu C^{14} şi apoi hidrolizat cu alcali a condus la obţinerea acidului C^{14}-metilen-*bis*-adenilic. Acest rezultat a constituit demonstraţia experimentală directă a formării legăturilor metilenice în timpul reacţiei moleculei de ARN cu formaldehida.

În ceea ce priveşte activitatea biologică a unor acizi nucleici trataţi cu formaldehidă, cercetările lui Fraenkel-Conrat (1954), Staehelin (1958) şi alţii au arătat că ARN extras din VMT îşi pierde activitatea infectantă, în prezenţa acestei substanţe. Şi în acest caz reacţia pare a fi specifică grupelor aminice ale bazelor azotate şi probabil presupune formarea fie a bazelor Schiff, fie a derivaţilor metilenici sau aminometilolici.

Reacţia formaldehidei cu unele componente ale ARN. Caracterizarea grupelor aminice prin titrarea după metoda Sörensen, a găsit o largă aplicare în studiul acizilor aminaţi, dar relativ mult mai restrînsă în cazul componenţilor acizilor nucleici. S-a presupus că reacţia dintre formaldehidă şi grupările bazice libere ale acizilor aminaţi ar putea să fie astfel formulată (*A*) :

(*A*) $$-NH_2 + NCNO \rightleftharpoons -N=CH_2 + H_2O$$

Cercetările ulterioare au arătat însă că grupele aminice ale acizilor aminaţi reacţionează cu una sau două molecule de formaldehidă (Lewin, 1964). Formularea care este astăzi atribuită acestei reacţii presupune constituirea N-monohidroximetil (*I*) şi N-dihidroximetil (*II*) derivaţilor, în două etape diferite ale interacţiunii. Prin urmare, blocarea grupei aminice nu are loc prin formarea bazelor Schiff cum precizează ecuaţia (*A*), ci prin cei doi derivaţi menţionaţi.

(*B*) $$HCHO + H_2O \rightleftharpoons H_2C(OH)_2$$

(*C*) $$H_2C(OH)_2 + R-\underset{\displaystyle COO^-}{\underset{|}{CH}}-NH_3^+ \rightleftharpoons R-\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{CH}}-NH-CH_2OH \quad (I)$$

(*D*) $$R-\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{CH}}-NH-CH_2OH + H_2C(OH)_2 \rightleftharpoons R-\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{CH}}-N(CH_2OH)_2 \quad (II)$$

În ceea ce priveşte grupele aminice libere ale bazelor azotate, componente ale acizilor nucleici, este de aşteptat ca ele să reacţioneze după un mecanism similar.

Într-adevăr, cercetările efectuate în acest scop au demonstrat că formaldehida reacţionează cu grupele aminice ale bazelor libere.

Lewin (1964) stabileşte, în urma unor analize spectrofotometrice şi cu ajutorul metodei variaţiei pH-ului, că interacţiunea maximă dintre formaldehidă şi adenină (1 : 1) are loc la gruparea N_{10}-aminică neionizată a ciclului purinic. Spre deosebire de rezultatele lui Fraenkel-Conrat (1954), care a obţinut rezultate negative în cazul uracilului, Lewin (1964) demonstrează că gruparea acidă iminică a acestei baze reacţionează cu o moleculă de formaldehidă. În comparaţie însă cu adenina, intensitatea reacţiei este mult mai scăzută. Este posibil ca acest fapt, alături de reversibilitatea reacţiei, să stea la baza rezultatului negativ înregistrat de Fraenkel-Conrat (1954).

Considerînd că fiecare moleculă de formaldehidă are nevoie de un singur atom de hidrogen la gruparea azotată cu care reacţionează, reacţiile reversibile care pot avea loc în cazul bazelor azotate sînt astfel formulate :

$$(E) \qquad > NH + HCHO \rightleftharpoons > N-CH_2OH$$

$$(F) \qquad -NH_2 + HCHO \rightleftharpoons -NH-CH_2OH$$

$$(D) \qquad -NH_2 + 2HCHO \rightleftharpoons -N(CH_2OH)_2$$

Cu ajutorul rezultatelor obţinute în urma utilizării metodelor gravimetrice, Feldman (1960) a dedus însă că două molecule de adenină se combină cu o moleculă de formaldehidă.

Izolarea şi identificarea acidului C ^{14}-metilen-*bis*-adenilic din produşii de hidroliză ai ARN tratat cu formaldehidă—C ^{14} au confirmat lui Feldman (1965) rezultatele sale anterioare şi au demonstrat existenţa şi a reacţiei (*G*) :

$$(G) \qquad {}_2[-NH_2] + HCHO \rightarrow -NH-CH_2-NH- + H_2O$$

Este important de menţionat că analizele spectrofotometrice ale produşilor de reacţie dintre formaldehidă şi adenină sau uracil au dovedit că aceste baze suferă pe de o parte creşterea densităţii lor optice şi pe de alta deplasarea maximului lor de absorbţie spre lungimi de undă mai mari (efect batocrom). Ambele modificări au fost semnalate, după cum s-a mai arătat, cu ocazia studierii cu aceeaşi metodă a acţiunii formaldehidei asupra ARN din VMT.

Aceasta demonstrează că schimbările spectrului de absorbţie al ARN se datoresc aceloraşi cauze, şi anume interacţiunii dintre grupele aminice ale bazelor sale cu formaldehida.

În cazul adeninei, ambele proprietăţi spectrale semnalate se intensifică o dată cu creşterea concentraţiei formaldehidei adăugate (fig. 82).

Concluzia care se degajă din aceste lucrări, că formaldehida reacţionează cu grupele aminice ale bazelor azotate ale ARN, se bazează şi pe alte observaţii. Astfel, inozin-monofosfatul care nu prezintă o grupă aminică nu reacţionează cu formaldehida (Steiner şi Beers, 1961); titrarea acidului poliadenilic în prezenţa formaldehidei arată că reacţia depinde de gruparea aminică a polimerului. Hoard (1960) demonstrează pe de altă

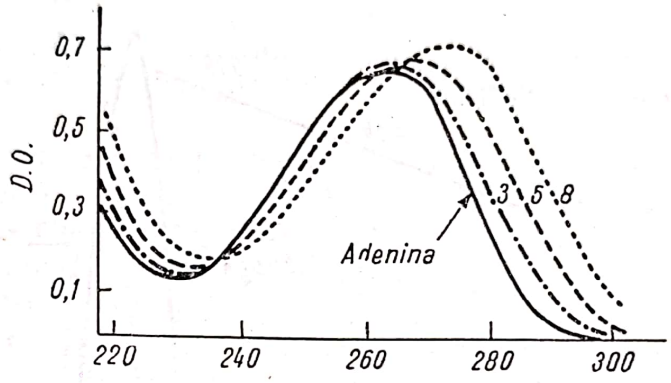


Fig. 82. — Reacţia adeninei cu diferite concentraţii de formaldehidă, urmărită spectrofotometric. Se remarcă atît creşterea efectului batocrom cît şi a celui hipercrom (după Lewin, 1964).

parte că reacţia dintre acidul citidilic şi formaldehidă este în funcţie de gruparea aminică a mononucleotidului.

Efectul HCHO asupra configuraţiei ARN înalt polimerizat. Concentraţiile mici de HCHO considerate ca inactive pentru structura secundară a acizilor nucleici înalt polimerizaţi s-au dovedit a avea efect asupra proprietăţilor lor cromatografice (Portocală şi colab., 1965, 1966; Popa şi colab., 1966 *c*).

Astfel, prezenţa concentraţiei de 0,4% HCHO într-o soluţie de ARN supusă analizei cromatografice pe AMC a determinat ca moleculele înalt polimerizate să nu poată fi eluate de pe coloană cu un gradient de NaCl.

Cercetările sistematice consacrate determinării cauzei rămînerii pe coloană a moleculelor înalt polimerizate ne-au arătat că mărimea efectului produs de HCHO este dependent de concentraţia acestui reactiv (fig. 83).

Proprietăţile schimbătoare de ioni ale acizilor nucleici depind atît de sarcina lor netă, care este în funcţie de structura lor primară, cît şi de repartizarea în spaţiu a acestor sarcini, ceea ce depinde de structura lor secundară şi terţiară. Întrucît în condiţiile experimentale utilizate în lucrările mai sus citate a fost exclusă posibilitatea ca HCHO să producă un efect de denaturare (ruperea legăturilor de hidrogen intramolecular),

modificările cromatografice observate sub influenţa HCHO au fost atribuite unor schimbări intervenite în structura terţiară a acizilor ribonucleici. În acest fel cercetările noastre demonstrează că în afară de reacţia sa cu grupele aminice libere ale acizilor nucleici (Fraenkel-Conrat, 1954;

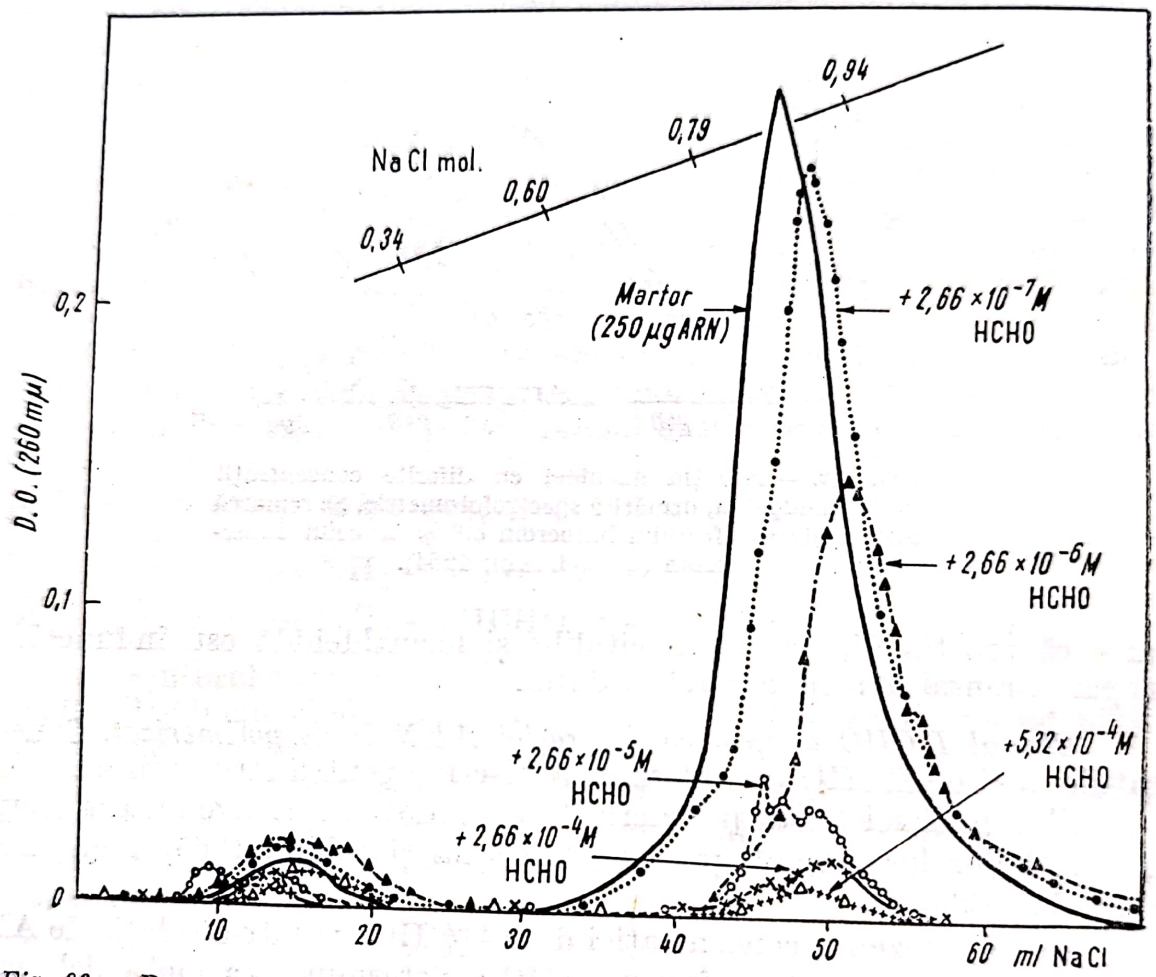


Fig. 83. — Dependenţa randamentului de eluţie de pe coloană de albumină metilată a moleculelor de ARN înalt polimerizate în funcţie de concentraţia formaldehidei prezentă în soluţie (după Popa şi colab., 1966 *c*).

Staehelin, 1958; Haselkorn şi Doty, 1961) şi de efectul de denaturare pe care îl determină asupra structurii secundare a polinucleotidelor (Haselkorn şi Doty, 1961; Mahler şi Pereira, 1962), formaldehida produce în concentraţii mici schimbări în structura terţiară a ARN înalt polimerizaţi. După părerea noastră HCHO în concentraţii sub 0,4% se adresează în primul rînd arhitecturii terţiare a macromoleculelor de ARN (şi ADN), iar în concentraţiile peste 0,4 — 0,5% ea acţionează asupra structurii lor secundare provocînd efectul de denaturare cunoscut.

Reacţia cu hidrazina

Levene şi Bass (1926) au fost primii cercetători care au descris reacţia nucleotidelor pirimidinice cu hidrazina. Cu acea ocazie s-a arătat că, în urma unui atac nucleofilic, acidul uridilic îşi desface ciclul pirimidinic formîndu-se pirazolonă. Reziduul ureic, care rămîne legat de riboză printr-o legătură glicozidică, poate fi îndepărtat prin hidroliză în mediu slab acid.

Mult mai tîrziu Witzel (1959) plecînd de la dinucleozid-monofosfaţi care conţin uridin-3′-fosfat, degradînd uracilul şi scindînd esterul β-carbonil-fosforic rezultat printr-o hidroliză alcalină a preparat nucleozid-5-fosfaţi.

Zilling şi colab. (1961) au studiat cinetica reacţiei hidrazinei, la diferite temperaturi şi pH-uri, cu cele patru nucleotide naturale ale ARN. Ei au constatat că atît acidul uridilic cît şi acidul citidilic sînt atacaţi de acest reactiv, astfel încît este imposibil de a obţine numai degradarea specifică a unuia dintre ei. Prin urmare în urma acestui tratament se poate obţine un ARN apirimidinic.

Reacţia cu acidul azotos

Acizii ribonucleici trataţi cu acid azotos suferă convertirea rezidiilor lor nucleotidice care au grupe aminice în compuşii hidroxi corespunzători. În timpul acestei reacţii nu s-a observat ruperea semnificativă a lanţului polinucleotidic (Fletcher şi colab., 1944).

Activitatea biologică a ARN din VMT este suprimată dacă numai cîteva din nucleotidele sale sînt alterate cu ajutorul acidului azotos (Gierer şi Mundry, 1958; Schuster şi Schramm, 1958).

Alături de această pierdere a infectivităţii ARN din VMT s-a pus în evidenţă şi existenţa unui puternic efect mutagen (Gierer şi Mundry, 1958).

Efectul mutagen al acidului azotos se datoreşte probabil inducţiei unor copieri alterate a mesajului genetic, ca urmare a dezaminării oxidative pe care o suferă în cursul acestui tratament unele baze azotate ale acidului nucleic.

Reacţiile care au loc între bazele ARN şi acidul azotos conduc la transformarea guaninei în xantină, a adeninei în hipoxantină şi a citozinei în uracil (fig. 84).

În anumite condiţii experimentale se poate realiza posibilitatea de a conduce reacţia de dezaminare numai asupra unei singure baze din ARN. Infectarea plantelor de tutun cu ARN extras din VMT astfel tratat a dus la apariţia unor tulpini mutante, care au diferit de tipul iniţial prin schimbarea unui singur acid aminat din lanţul proteic.

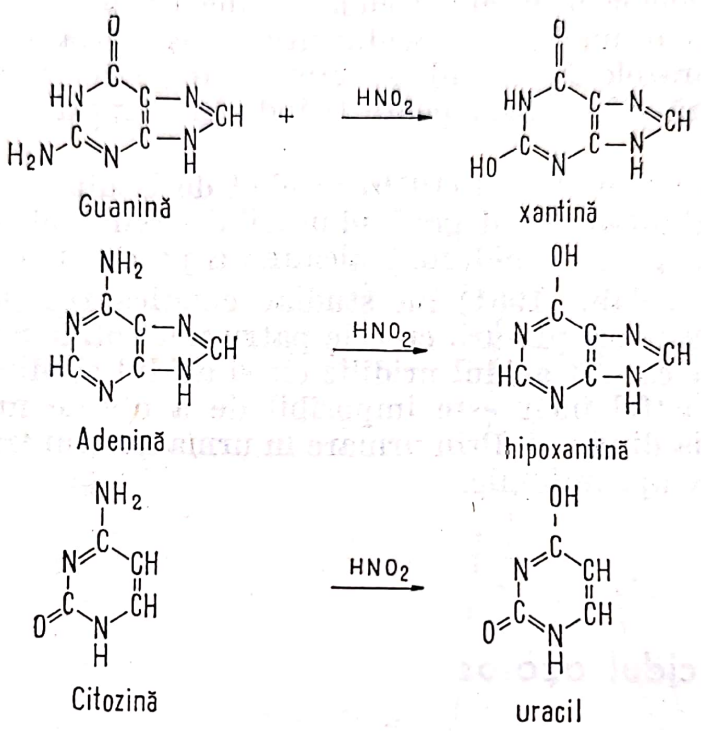


Fig. 84. — Dezaminările oxidative suferite de guanină, adenină şi citozină sub acţiunea acidului azotos.

S-a observat că, prin conversia guaninei cu xantină nu se ajunge la mutaţii, deoarece xantina este o bază azotată care nu se găseşte în mod natural în molecule de ARN, iar locul ei în timpul replicării este luat de către guanină; în consecinţă, se ajunge la aceeaşi bază: G→X →G. Prin dezaminarea adeninei se obţine însă hipoxantina, substanţă care, la fel ca şi xantina, nu se găseşte în mod normal în ARN. Locul ei este luat tot de către guanină. În timpul replicării, aceasta fiind singura substituţie posibilă, dezaminarea adeninei conduce la mutaţie datorită ciclului A→Hy→G.

Reacţia de dezaminare a citozinei conduce direct la substituţia ei cu uracilul C→U, transformare de asemenea mutagenă.

Substituirea unor acizi aminaţi în proteina VMT, cu ajutorul acidului ribonucleic al acestui virus tratat cu HNO_2, a fost semnalată de mai mulţi cercetători (Wittmann, 1961; Tsugita şi Fraenkel-Conrat, 1961 etc.).

Este interesant de arătat că din 16 substituţii descoperite pînă acum la mutantele VMT, 11 au fost explicate prin substituţia unui nucleotid dintr-o tripletă responsabilă de codificarea unui acid aminat.

După Wittmann (1962), schimbările pe care le poate induce acidul azotos, în 8 din cele 64 de triplete posibile ale celor 4 nucleotide de ARN, se pot reprezenta printr-un „octet" (fig. 85).

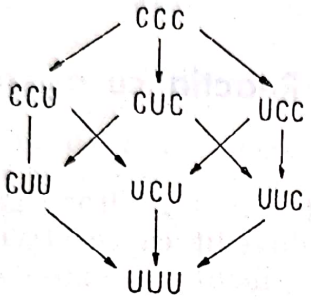


Fig. 85. — „Octetul" lui Wittmann (1962).

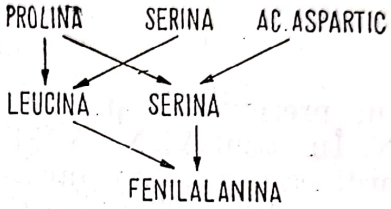


Fig. 86. — Inlocuirea unor acizi aminaţi în mutantele obţinute cu HNO_2 (după Wittmann, 1962).

Pentru toate cele 64 de triplete, substituţiile mutagenice pot fi reprezentate prin 8 „octete" corespunzătoare.

Wittmann (1962), analizînd 133 de tulpini mutante, dintre care 117 erau provocate prin tratarea ARN viral cu acid azotos, constată că 29 de tulpini se deosebeau de tulpina sălbatică prin înlocuirea unui singur acid aminat cu altul şi 6 tulpini prin înlocuirea a doi acizi aminaţi (fig. 86).

Rezultatele obţinute pot fi considerate ca o parte din modificările suferite în „octetul" tripletelor de tipul celui reprezentat în figura 85. Astfel, înlocuirea leucinei de către fenil-alanină se datoreşte modificării tripletului CUU în UUU etc.

Unele neconcordanţe dintre înlocuirile de acizi aminaţi observate la diferite mutante obţinute cu ajutorul ARN tratat cu HNO_2 şi substituţiile bazelor din triplete în urma dezaminării, pot fi provocate de trei cauze (Ochoa, 1963):

a) Existenţa unui alt cod, diferit de cel bazat pe triplete şi care încă n-a fost detectat.

b) Posibilitatea ca în urma acţiunii HNO_2 să aibă loc şi alte conversiuni decît $A \rightarrow G$ şi $C \rightarrow U$.

c) Înlocuiri parţiale datorite unor mutaţii spontane.

Această ultimă cauză pare să stea la baza înlocuirii asparaginei cu serina, argininei cu glicocolul şi treoninei cu metionina.

Cercetările efectuate cu diferiţi copolimeri sintetici trataţi cu HNO_2 au confirmat o parte din observaţiile înregistrate cu ajutorul ARN din VMT. Astfel, poli-UG (5/1) tratat cu HNO_2 îşi pierde capacitatea de a

stimula încorporarea acizilor aminați, deoarece în acest caz xantina, rezultată din substituția C→X, nu poate înlocui rolul guaninei. În schimb, acțiunea HNO_2 asupra polimerului poli-UC (5/1) s-a manifestat prin scăderea accentuată a activității sale de a stimula încorporarea serinei (tripleta UUC) datorită substituției C→U (Ochoa, 1963).

Reacția cu agenții alchilanți

Pînă în prezent s-a studiat efectul mai multor agenți alchilanți asupra ARN. În cazul ARN—VMT s-a dovedit că reactivitatea lor descreşte în ordinea: gaz muştar > dimetilsulfat > epoxizii > iodoacetat (Fraenkel-Conrat, 1961). Toți acești agenți par a avea cea mai mare afinitate pentru guanina din constituția ARN. Gazul muştar şi etilen-oxidul reacționează aproape exclusiv cu rezidiile guaninice, în timp ce iodoacetatul determină alchilarea apreciabilă a adeninei şi guaninei. La această concluzie s-a ajuns pe baza analizei cromatografice pe hîrtie a hidrolizatului obținut din ARN tratat cu agenții alchilanți amintiți.

Inițial s-a presupus că locul alchilării în molecula de ARN este gruparea aminică primară a nucleotidelor, la fel ca şi în cazul reacției acestei grupări cu formaldehida. Cercetările lui Fraenkel-Conrat (1961) au dovedit că azotul din poziția *1* sau *3* a *6*-amino-pirimidinelor este locul unde se produce alchilarea. În cazul guaninei se consideră că, cuaternizarea în poziția N_7 este reacția principală.

La o concluzie identică ajunge şi Lawley şi Brookes (1963) studiind acțiunea unor agenți alchilanți asupra ADN. După acești autori fixarea N-metil-*bis*-cloroetilaminei în poziția N_7 a guaninei poate avea drept consecință atît ruperea legăturii N_9-β-glucidică cît şi dimerizarea alchilică a guaninei. Prima reacție conduce la depurinarea moleculei de acid nucleic prin pierderea guaninei, în timp ce al doilea caz determină formarea unor legături transversale între două guanine din catenele polinucleotidice. Trebuie menționat însă că formarea legăturilor transversale diguanilice este maximă în cazul moleculelor bicatenare de ADN şi minimă la ARN şi ADN monocatenar (Brookes şi Lawely, 1961).

În ceea ce priveşte activitatea biologică a ARN—VMT tratat cu diferiți agenți alchilanți, s-a observat că introducerea în cele 6 500 de nucleotide cît conține macromolecula, a 1 pînă la 3 rezidii de agent alchilant conduce la inactivarea acestui acid nucleic în proporție de 73%. Pe de altă parte s-a constatat că numai dimetil-sulfatul determină apariția unor mutații, în timp ce ceilalți agenți alchilanți (gazul muştar, epoxizii şi iodoacetatul) produc numai inactivarea ARN — VMT (Fraenkel-Conrat, 1961).

Scanned with OKEN Scanner

În general se admite că efectul de inactivare produs de agenții alchilanți asupra acizilor nucleici biologic activi este datorat în special formării unor legături transversale de tip diguanilic în interiorul macromoleculei. Legăturile transversale induse împiedică duplicarea replicativă a moleculelor bicatenare de ADN sau chiar de ARN. Drept consecință sinteza moleculelor noi nu mai poate avea loc. În același timp datorită modificărilor de structură indusă, sinteza ARN-*M* cît și a proteinelor este puternic afectată.

Abbel și colab. (1965) studiind reacția gazului muștar cu poli-U au constatat că acest agent alchilant determină descreșterea capacității polinucleotidului de a codifica încorporarea fenilalaninei în proteină. Ei au demonstrat că gazul muștar acționează la nivelul grupării 5′-fosfatice terminale a poli-U. Experiențele acestor cercetători aduc argumente directe, prin care se dovedește că activitatea de mesager a ribopolinucleotidelor este afectată de către agenții alchilanți.

O serie de autori au studiat mecanismul de acțiune a unor agenți alchilanți asupra diferitelor etape de sinteză a acizilor ribonucleici. Acești cercetători au precizat că metilarea bazelor din ARN de transfer (Fleissner și Borek, 1962) sau din ARN ribozomal (Svensson și colab., 1963; Starr, 1963; Comb și Pinzino, 1964; Comb, 1965) are loc după ce structura lor primară a fost sintetizată.

Acțiunea ionilor metalici

O serie de autori au semnalat prezența unor ioni metalici în preparatele de ARN (Loring și Waritz, 1957; Wacker și Vallee, 1959; Fuwa și colab., 1960; Huff și colab., 1964). În cazul ARN—VMT s-au găsit următorii ioni metalici: Mg, Ca, Sr, Ba, Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Zn și Cu (Wacker și colab., 1963). Ultimii autori menționează că ionii metalici prezenți sînt atît de strîns legați de ARN încît îndepărtarea lor nu poate fi făcută fără a afecta structura macromoleculară. Legătura puternică ce există între ARN și ionii metalici determină pe unii cercetători să considere ionii metalici drept componente „intrinsece" ale ARN.

După Fuwe și colab. (1960) ionii metalici joacă un rol important în stabilizarea structurii secundare și terțiare a macromoleculelor de acizi nucleici.

Pe de altă parte s-a arătat că adăugarea în preparatele de acizi nucleici infectanți a unor ioni (Fe^{+2}, Cu^{+2}) ai metalelor grele determină inactivarea acestor produse (Bawden și Pirie, 1959; Fraenkel-Conrat, 1957—58). Ionii metalelor grele din grupa II B și elementele din prima tranziție au determinat o rapidă pierdere a infectivității ARN—VMT

încălzit la 65°C. În timp ce ionii de calciu şi magneziu nu afectează structura secundară a ARN—VMT la 65°C şi pH 8,5, ei determină pierderea rapidă a activităţii biologice a acestui acid nucleic (Huff şi colab., 1964).

Scăderea infectivităţii s-a remarcat şi în cazul ARN din virusul poliomielitei tratat cu ioni de calciu. Adăugarea tardivă de Ca^{+2} în aceste preparate a avut un efect mai slab decît atunci cînd adăugarea s-a făcut în faza iniţială a extracţiei (Lamb şi colab., 1965).

Atît prezenţa $NiCl_2$ cît şi a $CaCl_2$ în soluţiile de ARN—VMT încălzite la 65°C a determinat fracţionarea acidului nucleic, însoţită de pierderea rapidă a infectivităţii sale. Inactivarea produsă de ionii de Ni s-a dovedit a fi ireversibilă prin tratare cu EDTA.

Este interesant de menţionat că activitatea biologică a ARN—VMT este afectată într-un grad diferit de către unii ioni metalici. Astfel Cu^{+2}, Cr^{+2}, Fe^{+3} şi Pb^{+2} în concentraţii de 10^{-5}M, 2×10^{-7} M, 10^{-6}M şi respectiv 10^{-5}M au fost tot atît de eficienţi ca şi Ni^{+2} în concentraţii de 10^{-3}M la temperatura de 65°C. Pe de altă parte, în 24 de ore 0,75 M acetat de plumb hidrolizează total ARN—VMT pînă la mononucleotide. După un timp mai îndelungat se obţin chiar nucleozide.

În concluzie, se poate constata că preparate de acizi ribonucleici conţin unele metale care sînt considerate a fi componente intrinsece. Legătura extrem de puternică a ionilor metalici cu ARN îndepărtează posibilitatea existenţei unei simple legături electrostatice între ei şi grupările fosfat ale ARN. Mai degrabă ar fi vorba de formarea, între bazele azotate şi ionii metalici, a unor „complexe chelatice" (Wacker şi Vallee, 1959) de tip „sandwich", la fel ca şi în cazul ferocenului. Rolul metalelor „intrinsece" ar fi acela de a stabiliza structura secundară a ARN.

Spre deosebire de acest efect de stabilizare pe care îl au cantităţile mici de ioni metalici, adaosul lor în preparatele de acizi nucleici biologic activi determină inactivarea. Pierderea infectivităţii acizilor nucleici virali astfel trataţi este atribuită ruperii legăturii fosfodiesterice a macromoleculei, datorită catalizei provocate de ionii metalici. Acelaşi efect par să-l provoace şi elementele alcalino-pămîntoase.

Abbel C. W., Rossini L. A., Ramseur M. R. (1965), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **54**, 609.
Bawden F. C., Pirie N. W. (1959), J. gen. Microbiol., **21**, 438.
Berns K. I., Thomas J. (1961), J. mol. Biol., **3**, 289.
Brookes P., Lawley P. D. (1961), Biochem. J., **80**, 496.
Brown D. M., Philips I. H. (1965), J. mol. Biol., **11**, 663.
Brown D. M., Schell P. (1965), J. chem. Soc., 208.
Comb D. G., Pinzino C. J. (1964), Biochem. biophys. Acta, **87**, 688.
Comb D. G. (1965), J. mol. Biol., **11**, 851.
Feldman M. Ya. (1960), Biohimiia, **25**, 563.
Feldman M. Ya. (1965), Biohimiia, **1**, 203.
Fletcher W. E., Gulland J. M., Jordan D. O., Dibben H. E. (1944), J. chem. Soc., 30.

Fleissner D., Borek E. (1962), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **48**, 1 199.
Fraenkel-Conrat H. (1954), Biochim. biophys. Acta, **15**, 307.
Fraenkel-Conrat H. (1957–58), Harvey Lectures Ser., **53**, 56.
Fraenkel-Conrat H. (1961), Biochim. biophys. Acta, **49**, 169.
Freese E., Freese R. (1961), Virology, **13**, 19.
Freese E. (1963), *Molecular genetics*, Academic Press, New York, p. 235.
Fuwa K., Wocker W. E.C., Druyon R., Bartolomay A. F., Vallee B. L. (1960), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **46**, 1 298.
Gierer A., Mundry K. W. (1958), Nature, **182**, 1 457.
Grossman L., Levine S. S., Allison W. S. (1961), J. mol. Biol., **3**, 47.
Haselkorn R., Doty P. (1961), J. biol. Chem., **236**, 2 738.
Hoard E. (1960), Biochim. biophys. Acta, **40**, 62.
Huff I. W., Sastry K., Gordon M., Wacker W. E. C. (1964), Biochemistry, **3**, 501.
Lamb R. D., Chapin M., Dubes R. G. (1965), Arch. ges. Virusforsch., **15**, 486.
Lawley P. D., Brookes P. (1963), Exp. Cell Res., Suppl., **9**, 512.
Levene P. A., Bass L. N. (1926), J. biol. Chem., **41**, 167.
Levy, Silverman (1937), J. biol. Chem., **118**, 723.
Lewin S. (1964), J. chem. Soc., **155**, 792.
Loring H. S., Waritz R. S. (1957), Science, **125**, 646.
Mahler H. R., Da Silva Pereira A. (1962), J. mol. Biol., **5**, 325.
Ochoa S. (1963), Fed. Proc., **32**, 80.
Popa L., Portocală R. (1966), St. cerc. biochimie, nr. 1 (sub tipar).
Popa L., Cruceanu A., Lăcătuș V. (1966 *a*), Primul Simpozion de biofizică și biochimie, Sofia (sub tipar).
Popa L., Lăcătuș V., Cruceanu A. (1966 *b*), A treia conferință republicană de chimie, Timișoara (sub tipar).
Popa L., Popescu M., Lăcătuș V., Hörer O., Portocală R. (1966 *c*), Lucrare nepublicată.
Portocală R., Popa L., Hörer O., Lăcătuș V., Popescu M. (1965), Al III-lea Simpozion de biologie moleculară, Jena, R.D.G. (sub tipar).
Portocală R., Lăcătuș V., Popescu M., Morfei A., Popa L. (1966), Rev. Roum. Inframicrobiol., **3**, 85.
Sarkar N. K., Dounce A. L. (1961), Biochim. biophys. Acta, **49**, 160.
Schuster H., Schramm G. (1958), Z. Naturforsch., **136**, 697.
Schuster H. (1961), J. mol. Biol., **3**, 447.
Schuster H., Wittmann H. G. (1963), Virology, **19**, 421.
Sinsheimer R. L. (1959), J. mol. Biol., **1**, 43.
Staehelin M. (1958), Biochim. biophys. Acta, **29**, 410.
Starr J. L. (1963), Biochem. Biophys. Res. Comm., **10**, 428.
Steiner Beers (1961), *Polynucleotides*, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, p. 29.
Svensson I., Roman H. G., Eriksson K. G., Kjellin K. (1963), J. mol. Biol., **7**, 254.
Tessman I., Poddar R. K., Kumar S. (1964), J. mol. Biol., **9**, 352.
Tsugita A., Fraenkel-Conrat H. (1962), J. mol. Biol., **4**, 73.
Wacker W. E. C., Vallee B. L. (1959), J. biol. Chem., **234**, 3 257.
Wacker W. E. C., Gordon P. M., Hugg W. J. (1963), Biochemistry, **2**, 716.
Wittmann H. G. (1961), Naturwissenschaften, **48**, 729.
Wittmann H. G. (1962), Z. Vererb. Lehre, **93**, 491.
Witzel H. (1959), Ann. Rev., **620**, 126.
Zamenhof S., Hattie H. E., Leidy C. (1953), Biochim. biophys. Acta, **98**, 373.
Zilling W., Verwoerd D. W., Koalhage H. (1962), în *Acides ribonucléiques et polyphosphates*, C.N.R.S., Paris, 229.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 5

SINTEZA ACIZILOR RIBONUCLEICI

Biosinteza enzimatică

În ultimul timp s-au făcut progrese remarcabile în domeniul elucidării mecanismului de biosinteză a acizilor nucleici. O contribuţie de seamă la obţinerea primelor polinucleotide sintetice a fost adusă atît de rezultatele analizelor care au precizat structura macromoleculară a acizilor nucleici naturali, cît şi de numeroasele date experimentale acumulate despre sinteza şi repartizarea componentelor lor de bază.

Se cunosc astăzi mai multe tipuri de reacţii enzimatice de sinteză a ARN, iar numărul lor este în continuă creştere. Pe de altă parte, asistăm atît la clarificarea unor aspecte necunoscute ale mecanismului de biosinteză a sistemelor descrise mai de multă vreme, cît şi la extinderea cunoştinţelor noastre asupra multiplelor laturi pe care le poate prezenta biosinteza ARN. Cu toate că pînă în prezent s-au acumulat o serie de date complexe atît asupra structurii primare, cît şi secundare a polimerilor sintetizaţi, se cunosc încă destul de puţine lucruri despre mecanismul de acţiune şi funcţia fiziologică a enzimelor care sintetizează ARN. Acesta este motivul pentru care deosebirile dintre anumite tipuri de biosinteză se pot face, în unele cazuri, numai după a atentă analiză a caracteristicilor principale ale sistemelor enzimatice respective.

Dintre enzimele care sintetizează ARN, o deosebită importanţă o prezintă polinucleotid-fosforilaza, polimeraza ARN şi polimeraza virusurilor cu ARN sau, pe scurt, polimeraza virală. Toate aceste enzime sînt capabile de a sintetiza ribopolinucleotide cu proprietăţi fizico-chimice asemănătoare cu ARN naturali. Principalele caracteristici ale sistemelor enzimatice de sinteză a poliribonucleotidelor sînt prezentate schematic în tabelul 5. În afara enzimelor menţionate, se mai cunosc şi altele care determină sinteza unor polinucleotide cu secvenţa unică a unui nucleotid care se repetă în lanţul macromolecular (Edmonds şi Abrams, 1960; Abrams şi colab., 1962; Gottesman şi colab., 1962; August şi colab., 1962; Venkataraman şi Mahler, 1963) sau care induc adiţia limitată a riboadeni-

Tabelul 5

Principalele sisteme enzimatice care sintetizează poliribonucleotidele

Enzima	Substratul	Inițiatorul („primerul") reacției	Produsul	Referințe
Polinucleotid-fosforilaza	Nucleozid-5'-difosfați (ADP, GDP, CDP, UDP sau IDP)	Oligo -sau polinucleotide	Polinucleotide homo sau copolimeri în funcție de nucleozid - difosfații introduși în sistemul de reacție	Grunberg-Manago și Ochoa 1955
Polimeraza ARN*	Nucleozid-5'-trifosfați (ATP, GTP, UTP, CTP)	ADN, ADN și ARN	Polinucleotide cu o compoziție în baze identică cu a primerului	Weiss (1962), Nakamoto și colab. (1964), Abrams și colab. (1962)
Polimeraza virală	*Idem*	ARN	Polinucleotide cu o compoziție în baze identică cu a ARN întrebuințat ca primer. O parte din ARN sintetizați sînt bicatenari	August și colab. (1965)
ATP-polimeraza, CTP-polimeraza, UTP-polimeraza	ATP, CTP (respectiv UTP)	Poliribonucleotide sau poliadenilatul pentru prima și ARN pentru a doua și a treia enzimă	Poliadenilatul în primul caz, ARN în care s-a încorporat CTP pentru al doilea și UTP în cazul al treilea	Abrams și colab. (1962), Smellie (1962)
Sisteme enzimatice ce determină încorporarea nucleotidelor în poziții terminale sau subterminale	ATP, CTP	ARN	ARN la capătul căruia se încorporează AMP sau CMP	Hecht și colab. (1958)

* În această categorie am inclus atît polimerazele ARN dependente de ADN, cît și cele care sînt inițiate de ADN sau ARN. Motivele sînt arătate în text.

Scanned with OKEN Scanner

latului sau ribocitidilatului la lanţurile polinucleotidice preexistente (Hecht şi colab., 1959 ; Preiss şi colab., 1961 ; Furth şi colab., 1961 etc.).

În ceea ce priveşte polimeraza ARN, trebuie precizat că această enzimă sintetizează ARN după un mecanism similar cu acela al enzimei ADN, efectuată de polimeraza ADN. Acest caracter a determinat pe descoperitorii ei să denumească noua enzimă polimeraza ARN. Prezenţa acestor enzime a fost pusă în evidenţă în diferite ţesuturi ale animalelor sau ale plantelor, precum şi în mai multe bacterii. Activitatea polimerazei ARN, izolată din nucleii celulelor ficatului de şobolan (Weiss şi Gladstone, 1959) sau ai timusului de viţel (Abrams şi colab., 1962), precum şi a aceleia izolate din *E. coli* (Chamberlin şi Berg, 1962) au depins de prezenţa ADN în sistemul de sinteză. Produşii obţinuţi în aceste sisteme enzimatice au prezentat o compoziţie în baze similară cu aceea a ADN întrebuinţat ca „primer". Această particularitate a determinat să se susţină că polimeraza ARN induce sineza ARN pe matrice de ADN.

Pe de altă parte însă, s-a dovedit că polimeraza ARN izolată din unele bacterii catalizează sinteza ARN atît în prezenţa ADN, cît şi a ARN prin acelaşi tip de mecanism (Nakamoto şi Weiss, 1962). Ulterior s-a observat că una şi aceeaşi enzimă este responsabilă de ambele activităţi (Fox şi colab., 1964).

Ţinînd seama de cele arătate şi pentru a evita confuziile, vom descrie enzimele care catalizează sinteza ARN din cei patru ribonucleozid-trifosfaţi sub denumirea de polimeraze ARN, fără să le subdividem în polimeraze dependente de ADN sau de ARN şi ADN.

SINTEZA ACIZILOR RIBONUCLEICI CU AJUTORUL POLINUCLEOTID-FOSFORILAZEI

Grunberg-Manago şi Ochoa (1955) au izolat şi purificat pentru prima dată din *Azotobacter vinelandii* o enzimă care catalizează sinteza ARN din nucleozid-5′-difosfaţi. În cursul reacţiei se eliberează ortofosfat proporţional cu cantitatea de difosfat intrată în reacţie :

$$n\text{B—R—P—P} \underset{\text{Mg++}}{\overset{\text{Enz}}{\rightleftharpoons}} (\text{B—R—P})_n + n\text{P},$$

în care : B poate fi una sau mai multe din bazele azotate (adenina, hipoxantina, guanina, uracilul şi citozina), R reprezintă riboza, P—P pirofosfatul, iar P ortofosfatul.

Reacţia este reversibilă, şi anume : de la stînga spre dreapta conduce la formarea polinucleotidului $(\text{B-R-P})_n$ şi a ortofosfatului în cantitate stoechiometrică, în timp ce sensul invers, catalizat de aceeaşi enzimă, determină desfacerea fosforolitică a lanţului polinucleotidic cu formare de nucleozid-5′-difosfaţi.

După cum se remarcă, reacţia de mai sus este analogă sintezei şi scindării reversibile a polizaharidelor catalizată de fosforilază, fapt care

i-a determinat pe Grunberg-Manago şi Ochoa (1955) să o numească polinucleotid-fosforilază.

Constanta de echilibru a reacţiei este dată de expresia:

$$K = \frac{[(B-R-P)_n]\,[P]}{[B-R-P-P]}$$

Întrucît primerul (B-R-P) are o greutate moleculară mare, starea de echilibru este condiţionată de raportul $P/[B-R-P-P]$.

În general, starea de echilibru se stabileşte atunci cînd 60% pînă la 80% din fosfatul acidosolubil este eliberat sub formă de ortofosfat. Cercetările realizate cu ADP ca substrat au arătat că echilibrul se formează în momentul în care raportul dintre ortofosfat (P) şi nucleozid-5'-difosfat (ADP) este între 1,5 şi 2 (Ochoa, 1959).

Din punct de vedere termodinamic, reacţia catalizată de polinucleotid-fosforilază utilizează energia legăturii pirofosfatice din nucleozid-5'-difosfaţi pentru a forma legăturile fosfodiesterice din lanţul polinucleotidic.

Polinucleotid-fosforilaza a fost ulterior izolată şi purificată din extractele de *Escherichia coli* de Littauer şi Kornberg (1957), din *Micrococus lysodeikticus* de Beers (1956), din plante de Brummond şi Ochoa (1956) şi Brummond şi colab. (1957), din nuclei de ficat de Hilmoe şi Heppel (1957) etc., fapt care pledează pentru un mecanism general de acţiune al acestei enzime în diferite organisme. Dintre toate sursele bacteriene, *A. vinelandii* conţine polinucleotid-fosforilaza cea mai activă (tabelul 6).

Tabelul 6

Polinucleotid-fosforilaza izolată din diferite bacterii* (după Brummond, Staehelin şi Ochoa, 1957)

Bacteria	Activitatea relativă
Azotobacter vinelandii	100
Mycobacterium phlei	50
Micrococcus lysodeikticus	35
Escherichia coli (Crookes)	25
Escherichia coli (4157)	40
Micrococcus pyogenes var. *aureus* (Duncan)	70
Streptococcus hemolyticus	15
Streptococcus faecalis	2
Streptococcus lactis R	15
Pneumococcus (tip III)	7
Bacillus cereus	25
Clostridium kluyveri	2
Corynebacterium diphtheriae	5
Alcaligenes faecalis	90
Hydrogenomonas facilis	20

* Pentru activitatea polinucleotid-fosforilazei din *A. vinelandii* s-a luat valoarea egală cu 100.

Beers (1958) a urmărit efectul diferitelor săruri şi a pH-ului asupra vitezei de polimerizare a adenozin-*5'*-difosfatului în acid poliadenilic, cu ajutorul polinucleotid-fosforilazei extrase din *Micrococcus lysodeikticus*. El a observat că, spre deosebire de polinucleotid-fosforilaza din *Azotobacter vinelandii*, cea extrasă din *M. lysodeikticus* are nevoie pentru a-şi manifesta activitatea optimă de o concentraţie ridicată de K^+. Alţi autori au observat că, în timp ce sub influenţa polinucleotid-fosforilazei din *Azotobacter vinelandii*, polimerizarea celor patru nucleotid-*5'*-difosfaţi este realizată de către o singură enzimă, în cazul polinucleotid-fosforilazei din *M. lysodeikticus*, polimerizarea adenozin-*5'*-difosfatului şi a citozin-*5'*-difosfatului are loc în prezenţa unor enzime specifice (Olmsted, 1958 *a*, *b*). Trebuie menţionat însă că argumentele experimentale aduse în sprijinul acestor constatări sînt destul de puţine.

Studiul fosforolizei şi al polimerizării acidului poliadenilic cu ajutorul polinucleotid-fosforilazei izolate şi purificate din *M. lysodeikticus*, efectuat de Hendley şi Beers (1958), a scos în evidenţă unele proprietăţi noi ale acestei enzime.

Astfel, fosforoliza, ca şi polimerizarea, au loc în prezenţa ionilor de magneziu, dar concentraţia ridicată a acestor ioni inhibă polimerizarea însă nu şi fosforoliza. Totodată s-a observat că raportul ADP/ortofosfat în momentul stabilirii echilibrului este independent de concentraţia acidului poliadenilic. Acelaşi raport poate fi crescut de patru ori prin creşterea concentraţiei ionilor de magneziu şi scăderea forţei ionice a sistemului.

Grunberg-Manago şi Wisniewski (1957) şi Grunberg-Manago şi Fresco (1958) au izolat din drojdie o polinucleotid-fosforilază cu proprietăţi diferite de cele descrise mai sus. Astfel, polinucleotidul sintetizat cu ajutorul acestei enzime a fost ulterior complexat cu o proteină. După separarea polinucleotidului de proteină el se deosebeşte de un polinucleotid sintetizat de polinucleotid-fosforilaza din *Azotobacter vinelandii* prin comportarea sa în reacţia cu formaldehida, mobilitatea electroforetică, spectrul de absorbţie în ultraviolet ca şi prin produşii pe care-i eliberează în urma hidrolizei acide, bazice sau enzimatice.

Prezenţa iniţiatorului („primerului") în reacţia de polimerizare. Dacă sinteza polinucleotidelor se realizează cu ajutorul polinucleotid-fosforilazei, bine purificată, polimerizarea difosfaţilor are loc numai după o perioadă iniţială de latenţă. Această perioadă poate fi suprimată prin adăugarea unei cantităţi mici de oligonucleotide sau polinucleotide (fig. 87). Cînd se lucrează cu preparate enzimatice parţial purificate, perioada de latenţă este absentă datorită probabil existenţei în acest preparat a oligo- sau polinucleotidelor, conţinute sub formă de impurităţi.

Rolul iniţiatorului în reacţia de polimerizare nu este încă bine cunoscut, dar se presupune că oligonucleotidele întrebuinţate ca „primeri" ar surveni ca centre de amorsare ale polimerizării. Cu alte cuvinte, lanţul scurt al oligonucleotidelor reprezintă începutul lanţului

macromolecular şi pe el se adiţionează treptat unităţile de mononucleotide sub influenţa polinucleotid-fosforilazei (fig. 88) (Ochoa, 1959).

Pe de altă parte, este extrem de important de constatat că diferitele polinucleotide adăugate ca „primeri" pentru sinteza unui ARN au dovedit

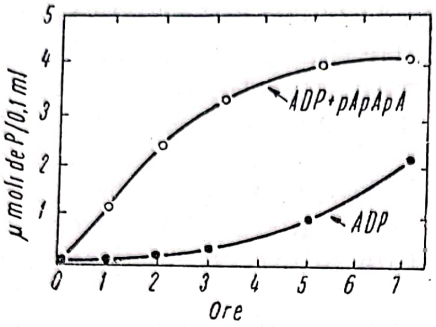


Fig. 87. — Efectul acidului triadenilic (pApApA) asupra sintezei poli-A. Se observă că în prezenţa acidului triadenilic sinteza poli-A are loc fără perioadă de latenţă (după Singer şi colab., 1958).

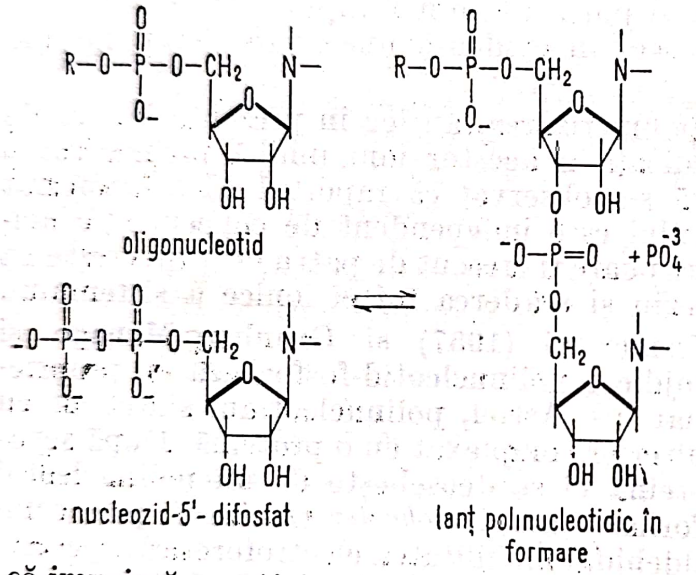


Fig. 88. — Mecanismul creşterii lanţului polinucleotidic sub influenţa polinucleotid-fosforilazei şi a unui oligonucleotid întrebuinţat ca „primer" (după Ochoa, 1959).

că imprimă reacţiei o anumită specificitate de acţiune. De exemplu, în cazul sintezei poli-AGUC, încercîndu-se influenţa ARN din drojdie, a poli-AGUC şi a ARN din *A. vinelandii*, adăugaţi ca iniţiatori, s-a observat că :

a) fără aceşti iniţiatori sinteza decurge cu un randament scăzut ;

b) ARN din drojdie are un efect stimulator asupra sintezei ;

c) adaosul de poli-AGUC are efect stimulator superior acidului nucleic din drojdie ;

d) randamentul cel mai bun al sintezei se obţine în prezenţa adaosului de ARN din *A. vinelandii* (fig. 89).

În continuare vom expune rezultatele care demonstrează că proprietăţile fizico-chimice ale poli-AGUC sînt asemănătoare cu cele ale ARN din *A. vinelandii*. Ca urmare a acestor constatări s-a presupus că sinteza ARN în *A. vinelandii* poate avea loc după un mecanism identic cu acela realizat *in vitro* cu polinucleotid-fosforilază şi în al doilea rînd că sinteza ARN poate să fie catalizată tot de un ARN.

Structura ribopolinucleotidelor sintetizate. Pentru a se cunoaşte compoziţia lanţurilor polinucleotidice sintetizate de polinucleotid-fosforilază,

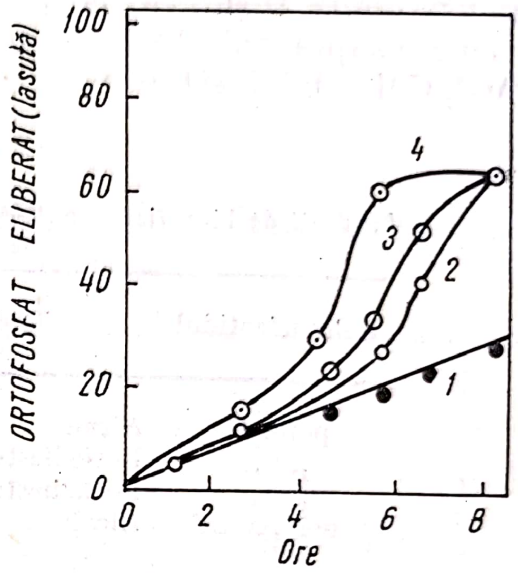


Fig. 89. — Sinteza poli-AGUC.
Curba *1*, fără iniţiator. Curba *2*, în prezenţă de 50 μg de ARN din drojdie. Curba *3*, în prezenţă de 50 μg de poli-AGUC Curba *4*, în prezenţă de 32 μg de ARN din *Azotobacter vinelandii* (după Mii şi Ochoa, 1957).

s-au efectuat asupra acestor produse aceleaşi reacţii de hidroliză care sînt întrebuinţate şi pentru analiza compuşilor naturali (tabelele 7 şi 8). Cunoscîndu-se mecanismul de acţiune a diferiţilor agenţi de hidroliză şi analizîndu-se produşii rezultaţi s-a stabilit structura polinucleotidelor sintetice.

Tabelul 7

Produşii de hidroliză a unor homopolimeri sintetici (parţial după Heppel, Ortiz şi Ochoa, 1957 *a*)

Polimerul	Tratamentul	Produşi de reacţie
poli-A	Alcali	*3'*-AMP, *2*-AMP
,,	Fosfodiesterază din splină	*3'*-AMP
,,	Fosfodiesterază din venin	*5'*-AMP
,,	Ribonuclează	nu hidrolizează
poli-U	Alcali	UMP
,,	Fosfodiesterază din splină	*3'*-UMP-
,,	Ribonuclează din splină	*5'*-UMP
,,	Ribonuclează	UMP
poli-C	Alcali	*3'*-CMP, *2'*-CMP
,,	Fosfodiesterază din splină	*3'*-CMP
,,	Fosfodiesterază din venin	*5'*-CMP
,,	Ribonuclează din splină	*2'*-CMP
,,	Ribonuclează	*3'*-CMP
poli-I	Alcali	*3'*-IMP, *2'*-IMP
,,	Fosfodiesterază din splină	*3'*-IMP
,,	Fosfodiesterază din venin	*5'*-IMP
,,	Ribonuclează	nu hidrolizează

Astfel, poli-A, poli-U, poli-C, şi poli-I, supuşi acţiunii alcalilor, au pus în libertate monofosfaţii izomeri corespunzători, şi anume: poli-A, a dat naştere la *2'* şi *3'*-AMP, poli-C, la *2'* şi *3'*-CMP etc. Aceeaşi hidroliză efectuată asupra poli-AGUC a determinat apariţia monofosfaţilor izomeri ai AMP, GMP, UMP şi CMP.

Tabelul 8

Produşii de hidroliză a poli-AU şi poli-AGUC (parţial după Heppel, Ortiz şi Ochoa, 1957 *b*)

Polinucleotidul	Tratamentul	Produşii de reacţie
poli-AU	Alcali	*3'*-AMP, *2*-AMP, UMP
„ „	Fosfodiesteraza din splină	*3'*-AMP, UMP
„ „	Fosfodiesteraza din venin	*5'*-AMP, *5*-UMP
poli-AGUC	Alcali	*3'*-AMP, *2*-AMP
		3'-GMP, *2*-GMP, UMP
		3'-CMP, *2'*-CMP
„ „	Fosfodiesteraza din splină	*3'*-AMP, *3'*-GMP
		UMP, *3'*-GMP
„ „	Fosfodiesteraza din venin	*5'*-AMP, *5'*-GMP
		5'-UMP, *5'*-CMP

Pe de altă parte, fosfodiesteraza din splină, care scindează lanţurile moleculelor de ARN cu punerea în libertate a *3'*-monofosfaţilor şi fosfodiesteraza din veninul de şarpe, care conduce reacţia de hidroliză a ARN la obţinerea de *5'*-monofosfaţi, a dat naştere şi în cazul compuşilor sintetici la aceeaşi produşi de hidroliză corespunzător celor naturali.

Prin reacţii specifice de acest tip s-a putut demonstra că poli-A este format dintr-un singur tip de nucleotid (AMP) înlănţuit de *n* ori în interiorul lanţului, poli-AGUC din patru mononucleotizi etc.

Totodată s-a putut demonstra că polimerii sintetici atît aceia care conţin un singur tip de nucleotid, cît şi cei care conţin mai mulţi nucleotizi, au lanţul molecular format din nucleotide unite între ele prin legături *3'*, *5'*-fosfodiesterice, la fel ca şi ARN naturali.

Menţionăm că analiza produşilor de hidroliză s-a făcut în special cu ajutorul cromatografiei şi electroforezei pe hîrtie (Heppel şi colab., 1957 *a*, *b*).

Analiza conţinutului în nucleotide a polinucleotidelor sintetice a arătat că există o proporţionalitate directă între conţinutul în nucleotide al lanţului polimer şi cantitatea de nucleozid-difosfaţi folosită pentru sinteza lui.

În cazul în care se iau pentru sinteză cantităţi echimoleculare din cei patru nucleozid-difosfaţi, se sintetizează un poli-AGUC care are conţinutul în nucleotide foarte asemănător cu ARN natural extras din *A. vinelandii*. Poli-AGUC se mai aseamănă în privinţa compoziţiei în nucleotide şi cu

alți ARN naturali extrași din diferite bacterii, dar este total diferit de cel extras din ficatul de iepure sau de unii de origine virală (tabelul 9).

Cu toate că poli-AGUC a fost sintetizat din cantități echimoleculare de nucleozid-difosfați, analiza nucleotidelor rezultate din hidroliza poli-AGUC arată că ele nu se găsesc în aceleași cantități în lanțul sintetizat,

Tabelul 9

Compoziția în nucleotide a unor acizi ribonucleici* (după Ochoa, 1958)

Sursa	Acidul adenilic	Acidul guanilic	Acidul uridilic	Acidul citidilic	$\frac{A+C}{G+U}$
A. vinelandii	10	13	7,5	9,0	0,93
*A. vinelandii***	10	12,5	8,0	10,5	1,00
Poli-AGUC***	10	14,5	8,5	12	0,95
Staph. aureus	10	10,5	7,0	8,5	1,05
A. faecalis	10	11,5	5,5	9,0	1,12
Mycobact. phlei	10	15,0	7,0	8,0	0,82
Esch. coli	10	10	8,5	8,5	1,00
Ficat de iepure	10	17	10,0	15,5	0,94
Virusul mozaicului tutunului	10	8,5	9,0	6,0	0,91
Virusul mozaicului	10	7,5	10,0	17,0	1,54

* Pentru acidul adenilic s-a luat valoarea 10.
** Analiza făcută fără izolarea prealabilă a ARN.
*** Preparat din cantități echimoleculare de ADP, GDP, UDP și CDP cu enzimă izolată din *A. vinelandii*.

ceea ce se datorește probabil faptului că polinucleotid-fosforilaza nu are aceeași afinitate față de cei patru nucleozid-difosfați.

Marea asemănare dintre compoziția în nucleotide a poli-AGUC și ARN din *A. vinelandii* a permis să se presupună că polinucleotid-fosforilaza din *A. vinelandii* a catalizat *in vitro* sinteza poli-AGUC, după un mecanism similar cu acela prin care se sintetizează *in vivo* ARN natural din *A. vinelandii*. Prin urmare este posibil ca polimerizarea nucleozid-5′-difosfaților sub influența polinucleotid-fosforilazei să fie una din căile de sinteză *in vivo* a moleculei de ARN.

Secvența nucleotidelor în lanțul macromoleculelor. Cu ajutorul polinucleotidelor sintetizate în care una din nucleotide a fost marcată cu P^{32}, s-au putut obține informații asupra distribuției nucleotidelor în interiorul lanțului macromolecular. Sinteza acestor ARN s-a realizat în prezența polinucleotid-fosforilazei și a unui amestec care a conținut un nucleozid-difosfat marcat cu P^{32} (de exemplu ADP*) și trei nucleozid-difosfați nemarcați. În acest fel s-au obținut polinucleotide marcate izotopic de tipul poli-AGUC. Hidroliza acestora cu ajutorul fosforilazei din veninul de șarpe a condus la un amestec de nucleozid-5′-monofosfați în care numai adenozin-5′-monofosfatul a fost marcat cu P^{32}. Pe de altă parte, hidroliza

alcalină sau cu fosfodiesteraza din splină a poli-AGUC a pus în libertate un amestec de nucleozid-*2'* şi *3'*-monofosfaţi marcaţi într-o egală măsură cu P^{32} (fig. 90).

Rezultatele obţinute după aceste hidrolize au stabilit că nucleotidul marcat este distribuit la întîmplare în interiorul lanţului polinucleotidic şi prin urmare în timpul sintezei moleculei de ARN prin polinucleotid-fosforilază nu are loc aşezarea nucleotidelor într-o anumită succesiune. Nu este exclus totuşi ca repartizarea nucleotidelor în interiorul lanţului macro-

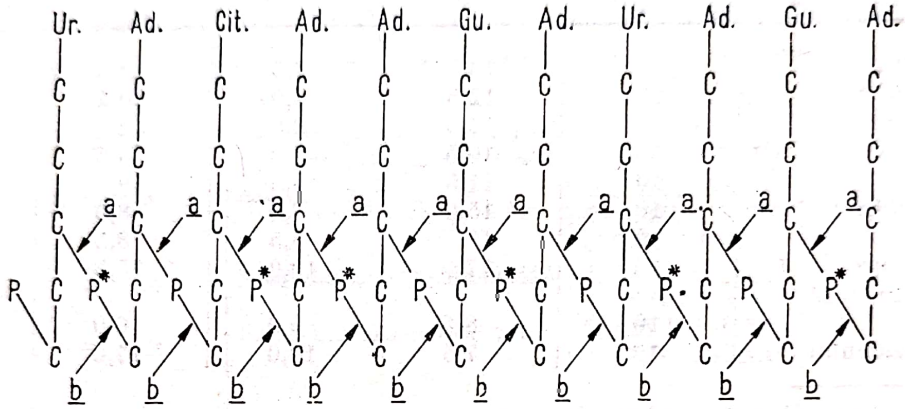


Fig. 90. — Schema de hidroliză a poli-AGUC de către fosfodiesteraza din veninul de şarpe (*a*) şi fosfodiesteraza din splină (*b*). (P*) reprezintă fosforul marcat (P^{32}), iar Ad, Gu, Cit şi Ur cele patru baze azotate (după Ortiz şi Ochoa, 1959).

molecular să urmărească o anumită legitate nedetectabilă prin mijloacele utilizate.

Greutatea moleculară. Analiza greutăţii moleculare a polinucleotidelor sintetice a arătat valori cuprinse intre 30 000 şi 2 000 000, limite între care se găsesc şi ARN naturali. S-a constatat că greutatea moleculară a poli-AGUC este aceeaşi cu a ARN extras din *A. vinelandii*, ceea ce aduce un argument în plus în favoarea identităţii celor doi produşi (Ochoa, 1958, 1959).

Rezultatele cercetărilor întreprinse cu ajutorul difracţiei razelor X asupra polinucleotidelor sintetice l-au condus pe Rich (1957) la concluzia că între structura poli-AGUC şi ARN natural nu există nici o diferenţă. Omopolimerii de tipul poli-A dau în schimb rezultate asemănătoare dar nu identice cu produşii naturali.

Interacţiunea polinucleotidelor. S-a observat că dacă se amestecă în soluţie poli-A cu poli-U, valoarea absorbţiei lor în ultraviolet, la lungimea

de undă a absorbţiei lor maxime (260 mμ), scade evident. În acelaşi timp, vîscozitatea acestei soluţii creşte foarte mult. Efectul hipocrom, ca şi modificarea vîscozităţii soluţiei, sînt atribuite interacţiunii dintre cele două lanţuri polinucleotidice. Între un lanţ de poli-A şi un altul de poli-U se formează legături de hidrogen de tipul celora existente în interiorul dublului helix a moleculei de ADN, fapt care poate explica modificările observate.

După Rich şi Davies (1956) interacţiunea dintre poli-A şi poli-U se datoreşte legăturilor de hidrogen care se formează între bazele complementare ale celor două lanţuri (fig. 91).

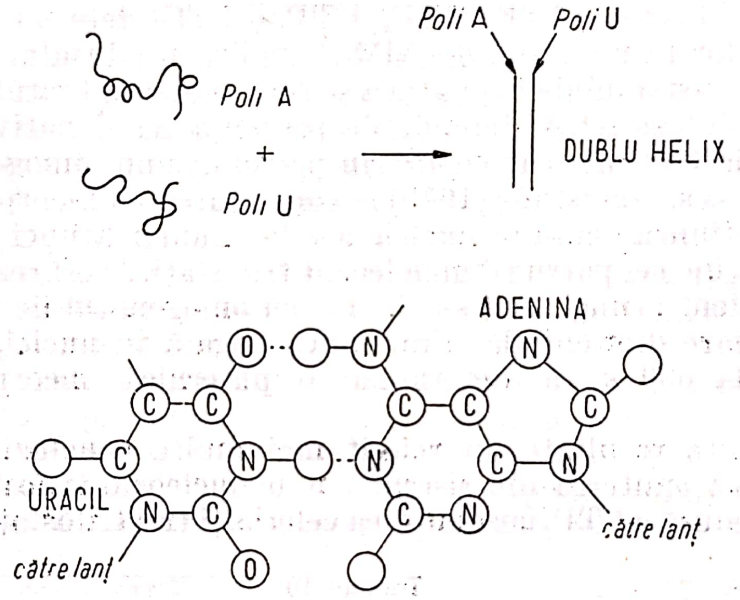


Fig. 91.

Formarea complexului poli-A + poli-U s-a putut pune în evidenţă şi prin metoda electroforetică, deoarece se observă că aceasta migrează ca un singur component cu o viteză intermediară situată între componentele individuale poli-A şi poli-U. Prin ultracentrifugare s-a remarcat de asemenea apariţia unei singure componente cu un coeficient de sedimentare mai ridicat decît al componentelor constitutive studiate în parte.

Este interesant de constatat că şi acidul poliadenilic singur poate avea o structură bicatenară, elicoidală (fig. 91). Această structură este stabilă şi în soluţie cu condiţia ca pH-ul să fie suficient de acid pentru ca aproximativ jumătate din grupele aminice primare să fie încărcate pozitiv (Fresco, 1959).

SINTEZA ACIDULUI RIBONUCLEIC CU AJUTORUL POLIMERAZEI ARN (NUCLEOTIDIL-TRANSFERAZA ARN *

După ce Grunberg-Manago şi Ochoa (1955), pe de o parte şi Kornberg şi colab. (1956) pe de alta, au demonstrat posibilitatea polimerizării *in vitro* a poliribonucleotidelor şi respectiv dezoxiribonucleotidelor, Weiss şi Gladstone (1959) au descris un nou sistem enzimatic care sintetizează ARN.

Primele cercetări efectuate în această direcţie au semnalat existenţa unei enzime în nucleii ficatului de şobolan, care în prezenţa celor patru ribonucleozid-trifosfaţi (ATP, GTP, UTP şi CTC) determină incorporarea ribonucleotidelor în molecula de ARN. Analiza produsului format ca şi a componentelor sistemului enzimatic a scos în evidenţă faptul neaşteptat că, în acest caz, sinteza ARN depinde de prezenţa ADN nativ (Weiss, 1960).

Incubaţia CTP marcat cu P^{32} în prezenţa unui omogenat de ficat a condus pe Weiss şi Gladstone (1959) la constatarea că încorporarea maximă a CTP în fracţiunea acidului nucleic are loc numai atunci cînd amestecul de reacţie conţine cei patru ribonucleozid-trifosfaţi. Acest rezultat a devenit mult mai evident atunci cînd s-a lucrat cu omogenatul de ficat fracţionat prin centrifugare diferenţială. Fracţiunea bogată în nuclei, obţinută prin centrifugare la 600 *g*, a determinat o puternică incorporare de CTP (tabelul 10).

Din aceste rezultate au reieşit mai multe concluzii, dintre care: a) s-a văzut că omiterea din sistem a unui nucleozid-trifosfat determină o încorporare redusă a CTP, iar omiterea celorlalţi trei trifosfaţi micşorează şi

Tabelul 10

Condiţiile de încorporare a CPT^{32} în ARN în prezenţa nucleilor de ficat după Weiss, 1962)

Amestecul de reacţie	Radioactivitatea ARN
Complet (în tampon TRIS)	3 872
Fără ATP	636
Fără UTP	280
Fără GTP	104
Fără ATP, UTP şi GTP	60
Complet + 20 μg ribonuclează	828
Complet + 20 μg dezoxiribonuclează	2 940
Complet + 10 μmoli de pirofosfat anorganic	100
Complet, în 100 μmoli tampon Pi, pH 7,5	4 030
Complet, ADP, UDP, GDP în loc de ATP, UTP, GTP	1 620
	128

* În mod obişnuit este cunoscută ca polimeraza ARN, în „Report of the Commision on Enzimes of the International Union of Biochemistry, IUB Symposium Series, vol. 20, Pergamon Press, Oxford, 1961" este denumită nucleotidil-transferaza ARN.

mai mult încorporarea CTP ; b) folosirea difosfaţilor sau monofosfaţilor în locul trifosfaţilor scade considerabil încorporarea CTP ; c) pirofosfatul anorganic inhibă puternic reacţiile de încorporare.

Încercările de a extrage factorul activ din nuclei prin distrugere sonică nu au dus la rezultate satisfăcătoare. În schimb, el a fost extras din nuclei lizaţi cu o soluţie hipotonică. Agregatul nucleoproteic obţinut din particulele lizate prin ridicarea concentraţiei sării şi apoi sedimentat prin centrifugare a conţinut întreaga activitate nucleară. Observaţia a fost deosebit de importantă, deoarece această fracţiune conţine în primul rînd ADN.

Reacţiile de încorporare efectuate cu agregatul nucleoproteic au demonstrat că acesta se comportă în acelaşi mod cu preparatul nucleic impur. Încorporarea optimă a CTP, ATP, GTP, UTP în ARN a avut loc numai în cazul în care s-au găsit cei patru trifosfaţi în sistem. Reacţia a fost inhibată de pirofosfatul şi nu de ortofosfatul anorganic prezent. „Enzima agregată", cum a fost numită iniţial această fracţiune, a arătat că activitatea ei depinde de prezenţa ionilor bivalenţi de Mg^{++} sau Mn^{++}.

Analiza chimică şi enzimatică a produsului reacţiei de încorporare a scos în evidenţă faptul că acesta are toate proprietăţile ARN. Produsul marcat a fost insolubil în acizi şi nedializabil. Prin degradarea ARN astfel sintetizat cu alcali şi venin de şarpe, s-au putut identifica în produşii de hidroliză cele 4 nucleozide; citidina, adenozina, guanozina şi uridina.

Pentru a demonstra că încorporarea nucleotidului marcat are loc în tot lungul lanţului polinucleotidic şi nu numai la capetele moleculei, produsul a fost hidrolizat cu fosfodiesteraza din veninul de şarpe. Cu această ocazie s-a considerat că viteza de degradare a polimerului a fost aproape identică cu viteza de apariţie a produşilor radioactivi acidosolubili (fig. 92).

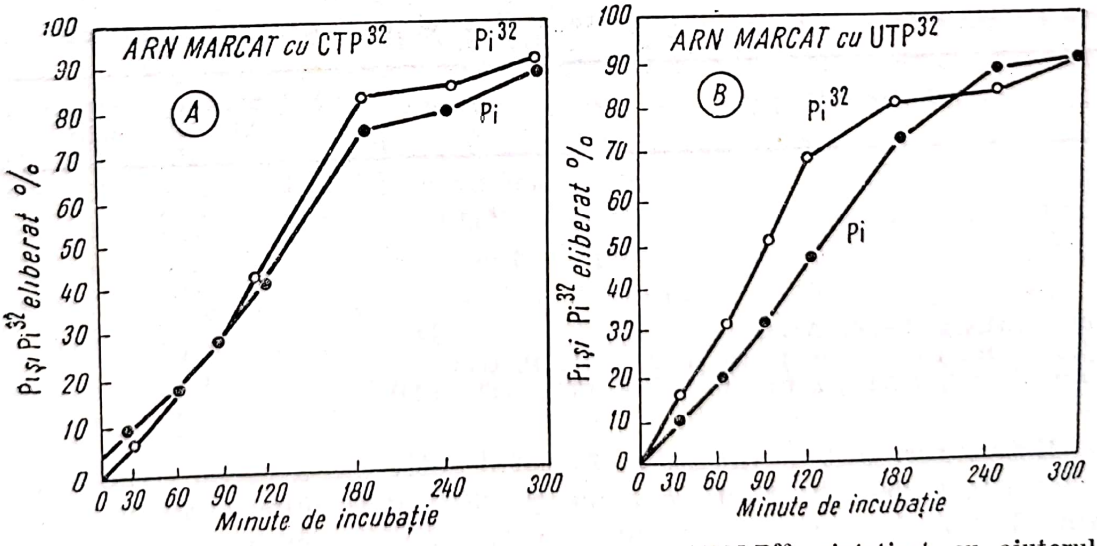


Fig. 92. — Hidroliza treptată cu venin de şarpe a ARN-P^{32}, sintetizat cu ajutorul polimerazei ARN. Procentele de Pi şi Pi^{32} eliberate sînt calculate din cantitatea totală de fosfor şi radioactivitatea ARN întrebuinţată în reacţie (după Weiss, 1962).

În cazul în care încorporarea ar fi avut loc în poziţia terminală a moleculei de ARN, atunci ar fi trebuit să se obţină prin hidroliză viteze diferite de eliberare pentru P_i^{32} şi Pi. Hidroliza efectuată cu alcali a acidului nucleic sintetizat a pus în libertate numai *2'* şi *3'*-nucleozid-monofosfaţi marcaţi. Aceste rezultate demonstrează în modul cel mai evident că ARN sintetizat de „enzima agregată" are nucleotidul marcat încorporat în tot lungul moleculei.

Sensibilitatea factorului activ din nuclei la acţiunea unor agenţi fizici pe de o parte, şi conţinutul bogat în ADN a nucleilor pe de altă parte, a polarizat atenţia asupra rolului pe care-l poate juca acest tip de acid nucleic în sinteza ARN. Cercetările preliminare au arătat că o preincubare a mediului de sinteză cu o cantitate mică de dezoxiribonuclează cristalină inactivează fracţiunea nucleară. Dacă însă la acest mediu se adaugă ADN din ficatul de şobolan, sistemul poate fi parţial reactivat.

În acest fel s-a putut aduce dovada evidentă că moleculele de ADN joacă un rol fundamental în sinteza unui ARN, realizată cu ajutorul „enzimei agregat" izolată din nuclei. Pentru a se demonstra că această modalitate de sinteză reprezintă un mecanism general al sintezei ARN în toate organismele, s-au întreprins încercări similare la microorganisme şi plante.

Dovezi în favoarea acestui punct de vedere au fost aduse de cercetările lui Weiss şi Nakamoto (1961). Aceşti autori au arătat că în *Micrococcus lysodeikticus* există o enzimă care catalizează o încorporare netă a ribonucleotizilor în molecula de ARN. Şi în acest caz sinteza are loc numai în prezenţa celor patru nucleozid-trifosfaţi şi a ADN (tabelul 11).

Tabelul 11

Factorii necesari pentru încorporarea CTP marcat cu P^{32} cu ajutorul extractelor de M. lysodeikticus (după Weiss şi Nakamoto 1961)

Nucleotizi adăugaţi	CMP marcat încorporat în ARN (mμmoli)
Complet	1,28
Fără ATP	0,02
Fără GTP	0,03
Fără UTP	0,02
Fără ADN	0,03
Complet, ARN în loc de ADN	0,03
Complet, ADP, UDP, GDP în loc de ATP, UTP, GTP	0,02
Complet, *d*-ATP, *d*-GTP, *d*-TTP în loc de ATP, GTP, TTP	0,01

Este interesant de arătat că factorul activ din aceste extracte, care ulterior a fost identificat cu o enzimă specifică, determină în primele 30 de minute la 25° o încorporare rapidă a nucleotidelor pentru ca, ulterior, viteza de reacţie să rămînă relativ constantă (fig. 93). Dacă în acest moment se adaugă un ADN sau nucleotid-trifosfaţi, reacţia nu este stimulată.

Scanned with OKEN Scanner

În schimb, adăugarea unei noi cantităţi de enzimă determină o sinteză identică cu aceea obţinută în primele 30 de minute, ceea ce a sugerat ideea că enzima este inhibată sau inactivată în timp. În acest sens, s-a observat că enzima se inactivează prin conservare la 37° într-o perioadă de timp relativ scurtă. Păstrarea preparatului enzimatic cîteva ore la temperatura camerei duce la scăderea considerabilă a activităţii sale.

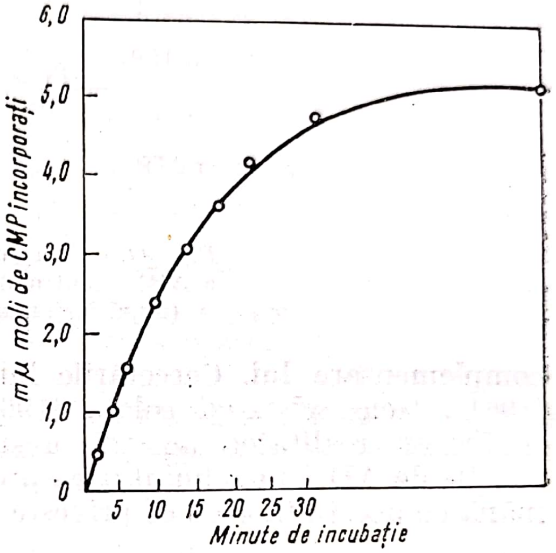


Fig. 93. — Încorporarea CMP în ARN în funcţie de timp, cu ajutorul polimerazei ARN extrase din bacterii (după Weiss, 1962).

Prezenţa acestui sistem enzimatic a fost ulterior descoperită şi în alte ţesuturi ale mamiferelor (Hancock şi colab., 1962) sau ale plantelor (Huang şi colab 1960), de asemenea şi în microorganisme (Stevens, 1960 ; Ochoa şi colab., 1964 ; Chamberlin şi Berg, 1962 ; Krakow şi Ochoa, 1963 ; Fox şi colab., 1964 *a*). Prezenţa polimerazei ARN în diferite ţesuturi animale, vegetale şi bacteriene sugerează ideea că această enzimă acţionează printr-un sistem general de sinteză a ARN în toate organismele. Mecanismul de sinteză a acizilor nucleici prin acest nou sistem enzimatic este asemănător celui de sinteză a ADN cu ajutorul polimerazei ADN, descris de Bessman şi colab. (1958). Pentru acest motiv, enzima descoperită de Weiss şi Gladstone (1959) a fost denumită „polimeraza ARN".

Ulterior, Nakamoto şi Weiss (1962) au observat că polimeraza ARN de origine bacteriană este capabilă să catalizeze în aceleaşi mod sinteza ARN, atît în prezenţa moleculelor de ADN, cît şi în prezenţa celor de ARN.

În cursul primelor cercetări nu s-a putut preciza dacă această sinteză este realizată de o singură enzimă sau de două diferite. Examinarea atentă a reacţiei în prezenţa celor doi „primeri", i-a condus pe Fox şi şi colab. (1964 *b*) la concluzia că ambele activităţi depind de existenţa unei singure enzime.

Scanned with OKEN Scanner

După Nakamoto şi colab. (1964), mecanismul de reacţie a sintezei unui ARN cu ajutorul polimerazei ARN poate fi formulat ca în figura 94.

Prezenţa moleculelor de ADN sau a celor de ARN în acest sistem de sinteză a ridicat problema rolului pe care îl au aceşti compuşi în mecanismul de reacţie. Din primul moment s-a presupus că ADN serveşte ca matrice pentru polimerizarea ribonucleotidelor în moleculele de ARN

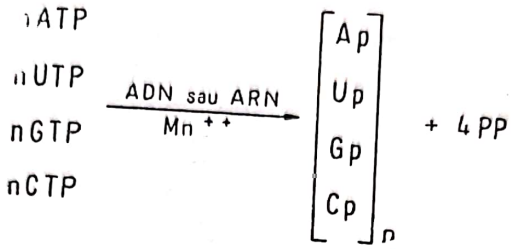


Fig. 94. — Mecanismul reacţiei de sinteză a ARN controlat de polimeraza ARN (după Nakamoto şi colab., 1964).

complementare lui. Cercetările lui Weiss şi Nakamoto (1961), Stevens (1961), Geiduschek şi colab. (1962), Hurwitz şi colab. (1962) etc., au confirmat realitatea acestei presupuneri. Astfel, s-a demonstrat că în funcţie de ADN întrebuinţat ca „primer" se obţine un ARN care se aseamănă cu acesta în ceea ce priveşte compoziţia în baze azotate (tabelul 12).

Tabelul 12

Compoziţia în baze a acidului ribonucleic sintetizat, comparată cu aceea a ADN- „primer" (după Weiss, 1962)

Baza	ADN *Pseudomonas*	ARN sintetizat		ADN *Salmonella*	ARN sintetizat	ADN *Serratia*	ARN sintetizat	ADN *E. coli*	ARN sintetizat
		Exp. 1	Exp. 2						
G	33,0	28,2	35,0	20,8	21	29,0	32,6	24,1	23,4
A	18,2	18,3	16,5	29,7	29	21,1	18,6	25,4	23,4
C	30,0	32,8	29,5	20,4	23	39,0	28,0	25,7	24,8
T (U)	18,8	20,7	19,0	29,1	27	20,9	20,8	24,8	28,4
GC	63,0	61,0	64,5	41,2	44,0	58,0	60,6	49,8	48,2
$\frac{A + T(U)}{G + C}$	0,59	0,64	0,55	1,43	1,27	0,72	0,65	1,01	1,07

Totodată, s-a dovedit că frecvenţa perechilor de baze din ARN nou sintetizat este similară frecvenţei bazelor corespunzătoare existente în ADN utilizat ca „primer". O dovadă în plus a fost adusă o dată cu realizarea de hibrizi de tipul ARN—ADN, numai între ARN obţinuţi cu ajutorul polimerazei ARN şi moleculele de ADN care au servit ca „primer" la sintetizarea lor.

Trebuie menţionat de asemenea că şi ARN întrebuinţaţi ca „primeri" au dus la obţinerea unor produşi complementari propriei lor molecule.

În cazul în care se utilizează un ADN ca „primer" reacţia poate fi reprezentată ca în figura 95.

Cu toate că experienţele efectuate *in vitro* au demonstrat că ambele catene de ADN „primer" sînt copiate şi că produsul rezultat este sensi-

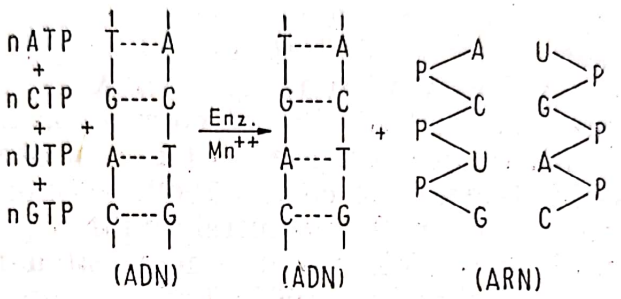


Fig. 95. — Schema de reacţie a sintezei ARN complementar (după Fox şi Weiss, 1964).

bil la acţiunea RN-azei (Chamberlin şi Berg, 1962 ; Hurwitz şi colab., 1962 ; Fox şi Weiss, 1964), există dovezi recente că *in vivo* numai o catenă a ADN este copiată (Marmur şi Greenspan, 1963 ; Hoyashi şi colab., 1963 ; Tocchini-Valentini şi colab., 1963).

Dintre toate polimerazele ARN extrase din diferite surse, numai aceea de proveniență microbiană a putut fi bine purificată, ceea ce a permis realizarea unor cercetări aprofundate a proprietăţilor ei şi, ca atare, a putut fi cel mai bine cunoscută. Cu ajutorul acestei enzime s-au putut preciza unele amănunte privind natura „primerului". Polimeraza ARN a dovedit că are o bună activitate de sinteză a ARN, chiar în prezenţa poliribonucleotidelor omopolimere sintetice, care în acest caz au rolul de matrice. Aceste substanţe au inhibat chiar funcţia de matrice a moleculelor de ADN prezente în sistem, fapt ce a sugerat ideea că ambele matrice se adresează aceleiaşi enzime.

Mai mult decît atît, experienţe realizate cu ajutorul unor polinucleotide sintetice au reuşit să stabilească rolul structurii secundare a „primerului" în reacţia de sinteză. Astfel, polimeraza ARN extrasă din *Azotobacter vinelandii* a fost mult mai activă în prezenţa poli-AU (1 : 1), care este constituit din două catene interacţionate, decît atunci cînd fost încercată faţă de polinucleotide monocatenare separate, de tipul poli-A sau poli-U (Krakow şi Ochoa, 1963). Fox şi colab. (1964) ajung la o concluzie asemănătoare în urma cercetărilor realizate cu polimeraza ARN purificată din *Micrococcus lysodeikticus*. Pe măsură ce se creştea gradul de ordonare a structurii secundare a unui polinucleotid monocatenar (poli-A), prin adăugarea unui al doilea polinucleotid complementar (poli-U), pentru a obţine complexul bicatenar poli-AU, activitatea sa ca „primer" era în aceeaşi măsură mai bună.

Spre deosebire de produşii sintetici, ARN naturali întrebuinţaţi ca „primeri" s-au dovedit a fi mai puţin eficienţi în reacţiile de sinteză catalizate de polimeraza ARN. Este cunoscut că acizii nucleici naturali sînt în marea lor majoritate construiţi din lanţuri polinucleotidice monocatenare. Pe de altă parte, experienţele efectuate cu polimeri sintetici mono- şi bicatenari care au dovedit superioritatea acestora din urmă, au generat întrebarea dacă ARN bicatenari naturali nu pot fi utilizaţi cu rezultate mai bune. Cercetările întreprinse în acest scop de Gomatos şi colab. (1964) au reuşit să demonstreze că ARN bicatenar extras din virusul REO reprezintă un „primer" eficient pentru polimeraza ARN. Este interesant de constatat că produsul obţinut a reflectat compoziţia în baze a ARN extras din virusul REO. Şi în acest caz, la fel ca şi atunci cînd reacţia a fost iniţiată de ADN (Hurwitz şi colab., 1962), actinomicina D a inhibat încorporarea ribonucleotidelor. După întrebuinţarea polimerilor sintetici, mono- sau bicatenari, şi a ARN naturali monocatenari, acest efect nu a fost observat (Krakow şi Ochoa, 1963 ; Fox şi colab., 1964).

Prin urmare, molecula de ARN bicatenar se comportă în acelaşi mod cu aceea de ADN, fapt ce demonstrează rolul fundamental pe care îl are, în primul rînd, structura secundară a „primerului", în reacţia de sinteză a ARN cu ajutorul polimerazei ARN.

Din datele prezentate mai sus rezultă că polimeraza ARN are un mecanism de acţiune total diferit atît de polimeraza ADN cît şi de polinucleotid-fosforilaza descoperită de Grunberg-Manago şi Ochoa (1955). Faţă de prima se deosebeşte în special prin aceea că ea realizează sinteza ARN din ribonucleozid-trifosfaţi atît în prezenţa moleculei de ADN „primer" cît şi a acelei de ARN. După cum se ştie, polimeraza ADN sintetizează ADN numai în prezenţa moleculei de ADN.

În ceea ce priveşte deosebirea dintre polimeraza ARN şi polinucleotid-fosforilaza, vom reaminti că :

a) Polimeraza ARN porneşte sinteza ARN de la nucleozid-trifosfaţi, în timp ce polinucleotid-fosforilaza de la nucleozid-difosfaţi.

b) Polimeraza ARN poate avea ca „primer" de reacţie atît ADN cît şi ARN, în timp ce polinucleotid-fosforilaza întrebuinţează ca „primer" numai molecule de ARN şi poate induce sinteza chiar în absenţa acestuia după o anumită perioadă de latenţă.

În urma cercetărilor asupra sistemului de sinteză a ARN cu ajutotul polimerazei ARN, se cunoaşte în momentul de faţă mecanismul sintezei acestor compuşi pe modelul moleculelor de ADN şi de ARN, mecanism care fusese ipotetic formulat în urma unor experienţe indirecte. Descoperirea sistemului enzimatic al polimerazei ARN are o importanţă teoretică şi practică deosebită. Pentru a ilustra acest lucru este suficient să arătăm că teoria transmiterii informaţiei genetice de la ADN la ARN sau de la ARN la ADN a primit prin descoperirea polimerazei ARN un suport experimental, de o netăgăduită valoare.

Scanned with OKEN Scanner

POLIMERAZA VIRALĂ

Cercetări realizate în ultimii ani au dovedit prezenţa unei activităţi polimerazice noi după infecţia unor celule cu virusuri care cuprind ARN. Astfel, infectarea culturilor de celule *in vitro* cu virus Mengo sau virus Polio a determinat apariţia unei noi polimeraze, în citoplasmă (Baltimore şi colab., 1963 ; Baltimore, 1964). Cercetarea enzimelor induse de cele două virusuri a dovedit că ele prezintă proprietăţi similare. În ambele cazuri activitatea optimă de încorporare a mononucleotidelor în molecula de ARN a depins de prezenţa ionilor de Mg^{++} şi a celor patru nucleozid-trifosfaţi. Activitatea polimerazică virală maximă a fost găsită în structurile citoplasmatice care au sedimentat între 50 000 şi 250 000 *g*. Cele două polimeraze induse de virusurile Mengo şi Polio nu au fost sensibile la acţiunea actinomicinei D, compus care inhibă toate sintezele normale de ARN.

Întrucît pe de o parte cinetica activităţii polimerazei virale a corespuns cu aceea a sintezei ARN viral, iar pe de alta activitatea enzimei a fost neinfluenţată de actinomicina D, s-a presupus că polimeraza virală induce sinteza ARN fără intervenţia ADN (Baltimore, 1964).

Polimeraza virală a fost izolată şi purificată de către August şi colab. (1965) şi de Shapiro şi August (1965) din extractele de *E. coli* infectat cu bacteriofagul F_2Sn_{II}. Sinteza ARN realizată cu această enzimă depinde de prezenţa ribonucleozid-trifosfaţilor adeninei, uracilului, guaninei şi citozinei, precum şi de prezenţa ionilor de Mg^{++}. Atît ARN-*S*, ARN-ribozomal al bacteriei, cît şi ARN-viral utilizaţi ca „primer" au reuşit să iniţieze reacţia de sinteză.

Totodată, enzima a catalizat schimbul dintre pirofosfatul anorganic, în prezenţa unei concentraţii relativ ridicate de pirofosfat anorganic.

Spre deosebire de polimeraza ARN din *E. coli*, care realizează sinteza ARN tot din nucleozid-trifosfaţi, în prezenţa unui ADN sau a unui ARN, şi care are o activitate mai mare în prezenţa primului decît a celui de-al doilea, polimeraza virală este dependentă numai de prezenţa unui ARN. O altă caracteristică care o deosebeşte fundamental de polimeraza ARN constă în faptul că extractele obţinute din bacteriile neinfectate sînt total inactive, în condiţiile în care sinteza determinată de polimeraza virală este realizabilă.

De asemenea, este interesant de observat că polimeraza virală nu acţionează în prezenţa polimerilor sintetici obţinuţi cu ajutorul polinucleotid-fosforilazei sau polimerazei ARN. Motivele acestei comportări nu sînt cunoscute, dar este posibil ca ele să fie condiţionate de structura acestor produşi (August şi colab., 1965).

Produşii reacţiei de sinteză ai polimerazei virale s-au dovedit a fi lanţuri polinucleotidice cu un conţinut de 300—400 unităţi ribonucleotidice unite între ele prin legături fosfodiesterice interne.

Scanned with OKEN Scanner

Totodată analiza lor a pus în evidenţă faptul că ARN întrebuinţat ca „primer" a servit ca matrice pentru sinteza noilor molecule care au avut o structură secundară bine definită.

După Baltimore (1964), polimeraza ARN provoacă apariţia în celule infectate a ARN virali, dintre care o parte se găsesc sub formă bicatenară şi al căror rol este fundamental în multiplicarea virusurilor care conţin ARN.

Sinteza acidului ribonucleic bicatenar viral. Marea majoritate a moleculelor de ARN din virusurile în compoziţia cărora intră acest tip de acid nucleic se găsesc sub formă monocatenară. În cursul infecţiei virale, rolul lor se aseamănă cu acela al ARN mesager în privinţa proprietăţii de a determina sinteza noilor proteine virale.

Spre deosebire de acest tip de ARN, numeroşi cercetători au semnalat în ultimii ani prezenţa acizilor nucleici bicatenari în unele celule infectate cu virusuri-ARN. Aceste descoperiri, de o importanţă deosebită, dau azi posibilitatea lămuririi unor etape intermediare caracteristice mecanismului de sinteză al acestor virusuri. Replicarea virusurilor-ARN ridică o serie de probleme încă nerezolvate, dintre care merită a fi subliniată în special modalitatea în care ARN monocatenar viral îşi poate îndeplini funcţia de matriţă pentru sinteza noilor molecule de ARN.

Este posibil ca lucrarea lui Sinsheimer şi colab. (1962) în care s-a remarcat că bacteriofagii de tipul ΦX174 ce conţin ADN monocatenar induc sinteza unui ADN bicatenar în timpul replicării lor, să fi sugerat ideea căutării unor ARN bicatenari în timpul infecţiei celulare cu virusuri-ARN.

Curînd după apariţia lucrării lui Sinsheimer, o serie de cercetători au semnalat prezenţa ARN bicatenar în cursul infectării cu virusuri-ARN a unor celule de diferite proveniențe. Astfel, Montagnier şi Sanders (1963), Baltimore şi colab. (1964), Pons (1964) au demonstrat acest lucru în cazul infectării unor celule animale cu virusuri-ARN; Shipp şi Haselkorn (1964), Ralph şi colab. (1965) în experienţe efectuate cu virusuri ale plantelor; Weismann şi colab. (1964), Kelly şi Sinsheimer (1964), Kelly şi colab. (1965) în cursul infecţiei bacteriene cu bacteriofagul MS_2; Kaerner şi Hoffmann Berling (1964) cu bacteriofagul fr.; Nonoyama şi Ikeda (1964) cu bacteriofagul β etc. Dată fiind importanţa acestor descoperiri, vom descrie succint cîteva amănunte în legătură cu lucrările citate mai sus.

Montagnier şi Sanders (1963) au observat în cursul cercetărilor lor asupra replicării virusului encefalomiocarditei (EMC) în celulele ascitice Krebs, apariţia unui ARN bicatenar cu proprietăţi infectante. Puţin timp mai tîrziu Baltimore (1964), analizînd cu ajutorul metodei de centrifugare în gradient de densitate de Cs_2SO_4 ARN extras din celulele HeLa infectate cu virus poliomielitic, după marcare cu uridină-2-C^{14}, a pus în evidenţă un ARN bicatenar cu un coeficient de sedimentare de 16 *S* şi o densitate de 1,60 $g\ cm^{-3}$.

În acelaşi timp, Kelly şi Sinsheimer (1964) au dovedit că ARN extras din *E. coli* infectat cu fagul MS_2 marcat cu P^{32}, supus centrifugării în gradient de zaharoză, prezintă două componente principale marcate izotopic; prima corespunde unui ARN monocatenar de MS_2 şi are coeficientul de sedimentare de 27 *S*, iar a doua de aproximativ 18 *S* (fig. 96 *A*).

Aceşti autori au analizat în continuare, tot prin metoda centrifugării în gradient de zaharoză, un ARN extras din celulele infectate după ce

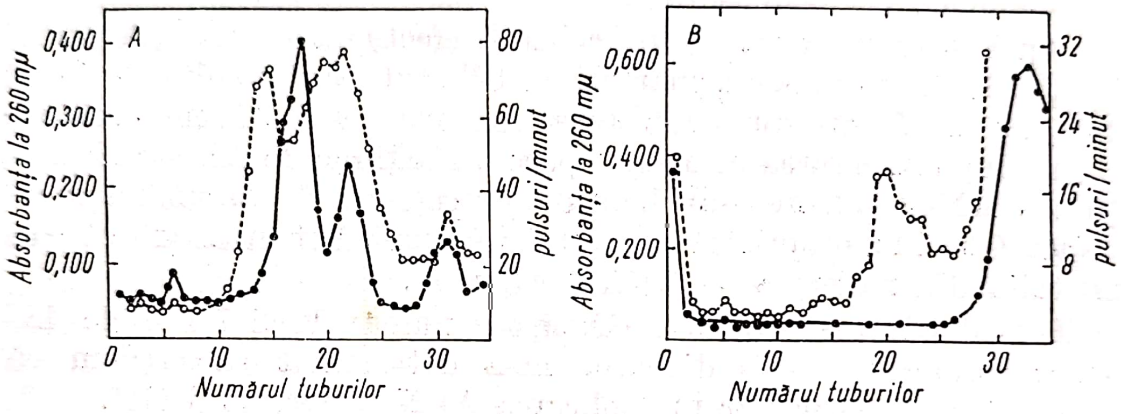


Fig. 96. — Distribuţia P^{32} (...o...o...) şi a absorbţiei în RUV (—o—o—) după sedimentarea în gradient de densitate a ARN extras din *E. coli* infectat cu fagul MS_2 marcat cu P^{32} (*A*). Acelaşi ARN după tratare cu RN-ază 0,5 μg/ml (*B*). Gradientul de zaharoză întrebuinţat a fost între 5 şi 20% (g/v) în Tris 0,1 M cu pH 7,3 la 5°C. Probele au fost centrifugate 6 ore la 37 000 t/m (după Kelly şi Sinsheimer, 1964).

a fost însă supus unui tratament blînd cu ribonuclează (0,5 μg/ml în 0,1 M Tris pH 7,3 + EDTA 0,02 M, timp de 20 min la 22°C). De data aceasta au observat că în timp ce ARN-ribozomal şi ARN-viral au fost complet hidrolizaţi, fracţiunea de ARN (a doua componentă) a cărei constantă de sedimentare a fost de 18 *S* a rămas rezistentă la acest tratament (fig. 96 *B*).

Rezultatele obţinute au sugerat autorilor interpretarea după care în timpul infecţiei celulelor cu fagul MS_2 apare o componentă nouă de ARN, probabil sub formă bicatenară, a cărui rol s-ar asemăna cu acela al compusului similar descris în alte ocazii de unii autori.

Cercetările lui Pons (1964) au meritul de a fi demonstrat că ARN bicatenar care se formează în timpul replicării virusului polio este infectant şi că el este într-adevăr un ARN de virus polio. Totodată acest autor a arătat că ARN bicatenar şi monocatenar infectant al virusului polio se găsesc în cantităţi aproximativ egale în cursul primelor 2—4 ore după infecţie. După acest interval de timp însă, cantitatea de ARN monocatenar creşte considerabil în timp ce ARN bicatenar creşte foarte puţin, astfel că după 7 ore de la infecţie ultimul reprezintă mai puţin de 1% din ARN infectant. Proprietăţile cromatografice ale celor doi ARN infec-

tanți, prezenți în infecția cu virusul polio, ca și ARN bicatenar ce apare în timpul infectării frunzelor de tutun cu VMT au fost descrise în capitolul despre fracționarea acizilor nucleici.

Un alt fapt important pe care-l semnalează Pons (1964) este legat de unele detalii ale metodei de fracționare a moleculelor de ARN infectant. Autorul menționează că fracționarea prin centrifugare în gradienți de zaharoză a acestui compus, la pH 7,2, determină pierderea aproape totală a infectivității sale. În schimb, centrifugările la pH 4,8 au dat rezultatele cele mai bune.

Analiza cromatografică pe coloană efectuată de noi (Portocală și colab., 1965) în cazul ARN marcați cu P^{32}, extrași din culturile de celule L la 3, 7 și 23 de ore după infectarea lor cu virusul MM ne-a arătat că: la 7 ore după infectarea celulelor apare o fracțiune de ARN rezistentă la acțiunea RN-azei, care s-a eluat de pe coloană de albumină metilată cu NaCl 0,68 M; proprietățile acestei fracțiuni demonstrează că ea este constituită din molecule de ARN bicatenare.

Faptul că acest tip de ARN apare numai după 7 ore de la infectarea celulelor și apoi dispare, ne-a determinat să credem că el are un rol de intermediar în replicarea ARN al virusului MM.

Este important de menționat că tot în acest an Hausen (1965) concomitent și independent de noi a reușit să demonstreze că virusul MM induce sinteza unui ARN bicatenar într-un sistem de celule L.

Există însă și unele lucrări, în care autorii arată că nu au reușit să pună în evidență formarea unui ARN bicatenar în cursul replicării anumitor virusuri. Astfel, Tobey (1964), urmărind replicarea virusului Mengo, comunică rezultatele negative înregistrate în acest caz. Cauzele care au dus la această concluzie nu sînt încă lămurite.

Trebuie precizat însă că marea majoritate a lucrărilor care au avut ca scop studiul apariției ARN bicatenar în cursul infecției cu virusuri-ARN au semnalat existența lui.

Din datele experimentale acumulate pînă acum, acest compus special, apărut în timpul infectării celulelor cu anumite virusuri, poate fi astfel caracterizat:

a) el apare numai în celulele infectate cu virusuri-ARN și este rezultatul activității polimerazei virale;

b) este rezistent la acțiunea RN-azei pancreatice;

c) prezintă o curbă de tranziție termică cu o pantă bruscă, avînd un punct de topire mijlociu (Tm) ridicat (situat la aproximativ 100°C);

d) are un coeficient de sedimentare cuprins între 16 și 20 *S*, cînd este centrifugat în gradient de zaharoză;

e) se eluează după coloana de albumină metilată înaintea ARN monocatenar infectant.

Bineînţeles că mai sînt necesare numeroase cercetări care să aducă date suplimentare şi mai ample asupra proprietăţilor şi structurii acestui produs.

Rolul biologic al acidului ribonucleic bicatenar viral. Replicarea virusurilor care conţin ARN sugerează în mod logic existenţa unui mecanism care utilizează acest acid nucleic drept matrice pentru sinteza noului ARN. Într-adevăr, în aceste cazuri întreaga informaţie genetică pentru sinteza proteinelor virale şi a enzimelor necesare multiplicării virusului se găsesc localizate în acidul lor ribonucleic. Pînă acum cîţiva ani nu se cunoştea un sistem enzimatic care să controleze sinteza ARN viral. Descoperirea recentă a polimerazei virale aduce astfel primele informaţii asupra replicării virusurilor-ARN.

Există în momentul de faţă suficiente dovezi care să ateste că virusurile-ARN nu se multiplică prin intermediul ADN celular. Astfel, actinomicina D, substanţă care inhibă toate sintezele de ARN dependente de ADN, este fără efect asupra multiplicării virusurilor care conţin ARN monocatenar. Această observaţie a condus la presupunerea că sinteza ARN viral nu este dependentă de ADN şi că enzima necesară multiplicării virusului sau se sintetizează *de novo* sub influenţa virusului-ARN sau este preexistentă în celula gazdă.

Faptul că numeroşi cercetători au reuşit să demonstreze apariţia polimerazei virale în diferite celule (bacteriene, animale şi ale plantelor infectate cu virusuri-ARN) şi absenţa acesteia în celulele neinfectate arată că ipoteza sintezei *de novo* a enzimei este fundamentată experimental.

Pe de altă parte, unii din produşii reacţiei de sinteză a polimerazei virale sînt ARN bicatenari. Ei apar numai în celulele infectate cu virusuri-ARN, fapt care sugerează ideea că aceşti compuşi reprezintă o formă replicativă a virusurilor de care ne ocupăm aici.

Etapele replicării virusurilor cu ARN nu sînt totuşi complet elucidate. După Ochoa şi colab. (1964) ele ar putea fi astfel formulate :

a) În prima etapă, ARN parental, monocatenar, pătruns în celulă, se combină cu ribozomii gazdei pentru a forma un polizom, care astfel capătă funcţia de a sintetiza polimeraza virală.

b) În etapa a doua, polimeraza virală induce sinteza unui ARN bicatenar pe modelul ARN parental.

c) În etapa a treia, ARN bicatenar determină replicarea ARN monocatenar printr-un mecanism asimetric semiconservativ.

Scanned with OKEN Scanner

SINTEZA POLINUCLEOTIDELOR CU SECVENȚĂ UNICĂ (UN SINGUR NUCLEOTID)

Analiza proceselor enzimatice prin care se poate sintetiza ARN în nucleii unor celule animale i-a condus pe Edmonds şi Abrams (1960) şi pe Abrams şi colab. (1962) să demonstreze existenţa a trei sisteme enzimatice de tip polimerazic care intervin în polimerizarea nucleozid-trifosfaţilor :

a) O polimerază ATP care catalizează formarea unui poliadenilat. Polimerizarea este iniţiată de un poliribonucleotid a cărui activitate este rezistentă la acţiunea RN-azei pancreatice şi a takadiastazei T_1, ceea ce dovedeşte că acest „primer" este un poliadenilat natural. Totodată poliadenilatul sintetizat de polinucleotid-fosforilază poate servi ca „primer" în această reacţie.

b) O polimerază CTP care catalizează încorporarea citozin-fosfatului într-un polinucleotid, sub influenţa ARN a cărui rol este de a iniţia reacţia de sinteză.

c) O polimerază ARN care determină încorporarea simultană a celor patru nucleozid-trifosfaţi în ARN. Activitatea ei dispare dacă este incubată în prezenţa DN-azei, iar produsul obţinut a arătat o mare asemănare în ceea ce priveşte compoziţia în baze cu aceea a ADN. Această enzimă este identică cu polimeraza ARN descoperită de Weiss şi Gladstone (1959), care a fost descrisă mai sus.

Cercetările lui Edmonds şi Abrams (1960) şi Abrams şi colab. (1962) au meritul de a fi dovedit existenţa mai multor tipuri de sinteză a ARN în aceiaşi nuclei ai celulelor animale.

Cu ajutorul unor sisteme enzimatice extrase din celulele tumorii ascitice Ehrlich, precum şi din alte celule animale s-a putut demonstra încorporarea selectivă şi a uridin-trifosfatului în ARN (Burdon şi Smellie, 1960 ; Smellie, 1962).

Fracţionarea cu sulfat de amoniu a extractelor obţinute din celulele ascitice Ehrlich a condus la izolarea a două componente A şi B, care au încorporat în mod diferit UTP marcat cu P^{32}.

În timp ce activitatea primei fracţiuni este stimulată de prezenţa celorlalţi trei nucleozid-trifosfaţi (ATP, GTP şi CTP), fracţiunea B nu este influenţată de aceşti compuşi. Pe de altă parte, în cazul fracţiunii B, încorporarea uridin-trifosfatului este stimulată de adaosul de acizi aminaţi, care în schimb sînt fără efect asupra reacţiei catalizate de fracţiunea A.

O altă deosebire constă în faptul că fracţiunea A încorporează UMP în interiorul lanţului de ARN, pe cînd fracţiunea B catalizează numai încorporarea UMP. Încorporarea UTP cu ambele fracţiuni enzimatice a fost stimulată de ARN al celulelor ascitice. ADN singur are un efect redus ; dacă el este însă adăugat împreună cu ARN, încorporarea este stimulată în cazul încercării fracţiunii A (Smellie, 1962).

Scanned with OKEN Scanner

ÎNCORPORAREA NUCLEOTIDELOR ÎN POZIȚII TERMINALE ALE ACIDULUI RIBONUCLEIC

S-au identificat pînă astăzi mai multe sisteme enzimatice care determină încorporarea limitată a ribonucleozid-trifosfaților adeninei și citozinei (X) la capătul unui lanț polinucleotidic preexistent :

$$\text{ARN} + \text{XTP} \rightleftharpoons \text{ARN} \cdot \text{XMP} + \text{PP}$$

Produșii acestor reacții acționează cu ARN acceptor pentru acizii aminați activați în timpul procesului de sinteză a proteinelor.

Experiențele lui Heidelberg și colab. (1956) au arătat că există o fracțiune citoplasmatică în ficatul de șobolan care poate determina încorporarea adenozin-monofosfatului marcat izotopic (P^{32}) în ARN. Analiza produsului obținut a dovedit că întreaga radioactivitate a rămas în AMP și că încorporarea s-a făcut la capătul moleculei. Astfel, hidroliza ARN cu fosfodiesteraza din veninul de șarpe a dus la obținerea adenozin-5′-fos-

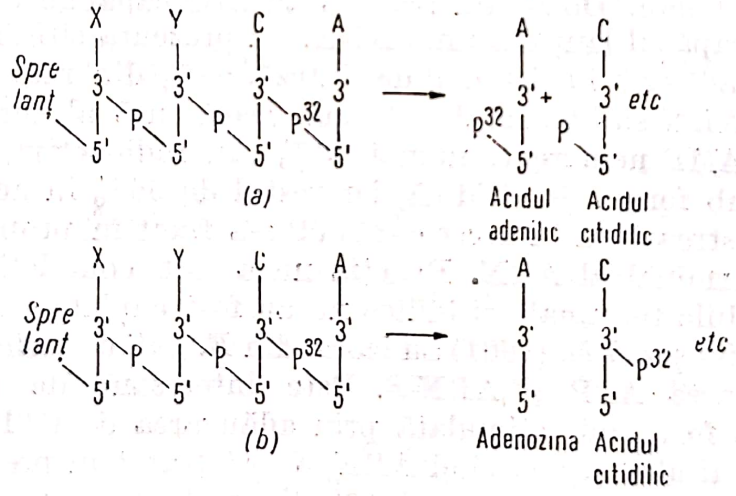


Fig. 97. — Hidroliza acidului ribonucleic, cu fosfodiesteraza din veninul de șarpe (*a*) și cu alcali (*b*).

fatului radioactiv, în timp ce hidroliza alcalină a dat naștere la acidul citidilic radioactiv. Aceasta demonstrează evident că AMP s-a fixat la capătul lanțului de ARN terminat cu CMP (fig. 97, *a* și *b*).

La rezultate similare a ajuns și Canellakis (1957) cu ajutorul unei fracțiuni citoplasmatice. Ulterior, s-au descris și alte sisteme enzimatice în diferite alte țesuturi.

Hecht şi colab. (1958) au încercat activitatea supernatantului obţinut din extractul de celule ascitice Ehrlich centrifugate. Acesta, precipitat la pH 5,2 şi separat de acizii aminaţi şi nucleotidele libere, a pierdut o bună parte din capacitatea lui de a fixa adenozin-monofosfatul terminal atunci cînd a fost incubat în prezenţa ATP marcat prin C^{14}. Dacă însă la sistem s-a adăugat CTP-C^{14}, puterea lui de a fixa AMP a crescut foarte mult. Explicaţia dată a fost următoarea : CMP fixat de ARN a creat posibilitatea ca adenozin-monofosfatul să se poată ulterior fixa. Hidroliza alcalină a produsului obţinut a arătat că 85% din C^{14} se găseşte în adenozină şi 15% în AMP. Aceste rezultate au fost prea puţin influenţate de prezenţa în timpul sintezei a altor nucleozid-trifosfaţi (Hecht şi colab., 1959).

ARN-*S* extras cu fenol din citoplasma ficatului de şobolan şi fracţionat pe o coloană de celuloză Ecteola se separă în două componente, dintre care prima s-a dovedit capabilă de a incorpora AMP la capătul lanţului ei molecular (Goldthwait, 1959). De asemenea ARN extras cu fenol din drojdie încorporează AMP la capătul moleculei sale, în prezenţa unei enzime izolate din muşchiul de iepure (Goldthwait şi Starr, 1960).

Alţi autori, printre care Herbert (1958), Canellakis (1959) şi Canellakis şi Herbert (1960) au izolat trei ribonucleoproteine din citoplasma ficatului de şobolan. Două din acestea au fost capabile de a încorpora nucleotide la capătul lanţului unui ARN. În prezenţa citidin-trifosfatului marcat cu C^{14} adăugat în sistemul de sinteză, 90% din radioactivitate s-a încorporat în ARN sub formă de citidină. Dacă însă alături de CTP-C^{14} se adaugă şi AMP nemarcat, numai 33% din radioactivitatea CTP-C^{14} se regăseşte sub formă de citidină, iar restul de 66% în acidul citidilic, ceea ce demonstrează că în acest caz ATP s-a fixat în proporţie de 66% de CMP-C^{14} terminal al ARN. Reacţia nu a fost completă deoarece o parte din rezidiile terminale citidilice nu au fost cuplate cu AMP. Pe de altă parte, Preiss şi colab. (1961) au izolat din *E. coli* o enzimă care determină încorporarea ATP şi ARN-*S*. Este interesant de constatat că încorporarea a fost mult stimulată prin adăugarea de CTP în sistemul de reacţie şi mai ales atunci cînd ARN a fost tratat în prealabil cu fosfodiesterază în aşa fel încît numai 5% din moleculă a fost hidrolizată. Analizarea produşilor rezultaţi în urma hidrolizei efectuate cu fosfodiesterază din veninul de şarpe şi NaOH a demonstrat că atît ATP cît şi CTP se încorporează în poziţiile terminale ale ARN-*S*.

Aceste rezultate dovedesc existenţa unor enzime specifice în diverse celule, care au proprietatea de a controla încorporarea atît a AMP cît şi a CTP la capătul moleculelor de ARN-*S*. Merită a fi menţionat faptul că experienţele efectuate cu aceste sisteme enzimatice au reuşit să demonstreze că ARN-*S* extras din diverse surse are secvenţa terminală -pCpCpA.

Scanned with OKEN Scanner

Sinteza neenzimatică a acizilor ribonucleici

Esterii polifosfaţilor (EPF) s-au dovedit a fi agenţi de condensare deosebit de utili atît pentru sinteza peptidelor cît şi a unor polinucleotide. Avantajul mare pe care îl prezintă întrebuinţarea EPF în astfel de sinteze constă în faptul că reacţiile decurg în condiţii blînde, iar produşii obţinuţi nu suferă racemizare. Tot ca un avantaj poate fi considerat faptul că prepararea EPF se face uşor. Ei se sintetizează prin disolvarea P_2O_5 în eter etilic sau alţi solvenţi care conţin grupări alcoxilice. EPF este un material vîscos care este constituit probabil dintr-un amestec de compuşi ciclici şi liniari cu diferite greutăţi moleculare (Schramm şi colab., 1962).

Ideea întrebuinţării EPF la sinteza polinucleotidelor s-a bazat pe examinarea mecanismului unor reacţii enzimatice de următorul tip :

(*1*) Glucozo-*1*-difosfouridina + fructoză → zaharoză + uridinfosfat

(*2*) Glucoză-*1*-fosfat $\xrightarrow{\text{fosforilază}}$ amidon + fosfat

(*3*) Riboză-*1*-fosfat + uracil $\xrightarrow{\text{uridin fosforilază}}$ uridină + fosfat

(*4*) 5′-Fosforibozil-*1*-pirofosfat $\xrightarrow{\text{nucleotid-pirofosforilază}}$ acid adenilic + + pirofosfat

(*5*) Nucleozid-difosfat $\underset{\leftarrow}{\overset{\text{polinucleotid-fosforilază}}{\rightleftharpoons}}$ ARN + ortofosfat

(*6*) Dezoxinucleozid-trifosfat ⟶ ADN + pirofosfat

(*7*) ARN—*S* + ATP + acid aminat ⟶ aminoacil—ARN—*S*

În reacţiile (*1*—*4*) are loc activarea unui hidroxil acetalic, în (*5* şi *6*) activarea unei grupe fosfatice secundare, iar în (*7*) activarea unei grupe carboxil.

Cele mai multe sinteze enzimatice sînt caracterizate prin activarea grupelor hidroxilice, care în primul rînd sînt transformate într-un ester de fosfat, iar apoi ele reacţionează cu o grupă hidroxi sau azotată a componentei a doua, eliminîndu-se gruparea fosfat.

Activarea grupărilor amintite în reacţiile enzimatice este realizată de către o enzimă specifică. Pentru a se realiza reacţii de acest fel pe cale neenzimatică, a fost necesară găsirea unui agent care să înlocuiască funcţia enzimei. Or, Schramm şi Wissman (1958) şi Schramm şi colab. (1961 şi 1962) demonstrează că EPF poate fi întrebuinţat în acest scop.

Schramm şi Wissman (1958) au arătat că EPF reacţionează în prima etapă cu gruparea aminică a unui acid aminat, cu formare de ester fosfoamidic. În etapa a doua, grupa aminică astfel activată se combină cu

Scanned with OKEN Scanner

gruparea carboxilică a unui alt acid aminat. Metoda a fost întrebuințată pentru policondensarea acizilor aminați și a peptidelor. Cu ajutorul ei s-a putut sintetiza poliarginina, cu o greutate moleculară de aproximativ 4 000.

Sinteza nucleozidelor. În prezența EPF diferite zaharide pot fi combinate cu bazele heterociclice pentru a obține nucleozide, astfel:

(*A*) Riboza + adenina $\xrightarrow{\text{EPF}}$ adenozina + *2'*, *3'* adenozin-fosfatul

(*B*) Fructoza + adenina $\xrightarrow{\text{EPF}}$ fructozil-adenina.

Produsul rezultat în reacția (*A*) a fost identificat ca *9*-β-ribozil-adenina cu ajutorul spectroscopiei în ultraviolet și infraroșu și a valorii *Rf* în cromatografia realizată cu diferite sisteme de solvenți. Sinteza decurge cu un randament bun, iar adenozina astfel preparată nu se deosebește cromatografic și spectrofotometric de produsul natural similar. Compușii secundari ai reacției sînt la rîndul lor identici cu produșii naturali.

După Schramm și colab. (1962) sinteza adenozinei prin intermediul EPF are loc ca în figura 98.

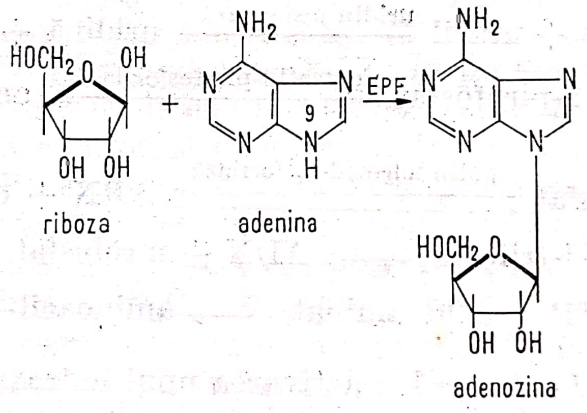


Fig. 98. — Sinteza adenozinei din riboză și adenină, cu ajutorul esterilor polifosfaților (după Schramm și colab., 1962).

Sinteza acizilor nucleici prin policondensarea nucleotidelor. Activarea grupei fosforice a nucleotidelor a fost realizată de diferiți cercetători prin mai multe metode. În acest scop, Michelson (1959) a întrebuințat tetrafenil-pirofosfatul sau difenil-fosfocloridatul, Tener și colab. (1958) diciclohexil-carboimida, iar Cramer (1961) enol-fosfatul esterului malonic. Fosfații activați prin aceste metode au fost condensați apoi obținîndu-se, cu randament mic, oligonucleotide al căror grad de polimerizare a fost de numai 5—12.

Dificultatea principală care intervine în sinteza lanțurilor lungi de polinucleotide constă în ciclizările intermoleculare. În schimb, în soluții

foarte concentrate, a apărut evidentă posibilitatea de a favoriza condensarea intramoleculară a nucleotidelor activate, în detrimentul ciclizării intermoleculare (Schramm şi colab., 1961, 1962). Aceşti autori au reuşit, prin amestecarea directă la 50—60° a mononucleotidelor cu EPF vîscos, să obţină, cu un randament bun, polinucleotide cu greutate moleculară înaltă. Adaosul de piridină catalizează reacţia. Randamentul polinucleotidelor obţinute după dializă a fost de 10—20%.

În tabelul 13 sînt prezentate proprietăţile unor polinucleotide sintetizate prin această metodă.

Tabelul 13

Proprietăţile macromoleculelor sintetizate cu ajutorul EPF (după Schramm şi colab., 1962)

Produsul	S_{20}		Greutatea moleculară (G. M.)	Hipercromia
Poli-A	2,5	25	21 000	37%
Poli-C	2,0	23	15 000	16%
Poli-G	2,9	28	28 000	28%
Poli-U	4,0	35	50 000	20%
Poli-T	2,3	24	18 000	47%

Greutatea moleculară a polimerilor este de ordinul a 20—50 000, ceea ce dovedeşte că lungimea lanţului cuprinde mai mult de 100 de nucleotide.

Natura intermediarilor care apar în cursul reacţiei nu este încă cunoscută. Probabil că în primul rînd monofosfaţii se transformă în fosfaţi ciclici, care pot reacţiona mai departe cu EPF formînd esteri pirofosforici. Deoarece pentru atacul grupei fosforice active sînt accesibile două grupe hidroxil la nucleotidul învecinat, nu există certitudinea unei structuri sterice unitare a polinucleotidelor sintetizate. Alături de legăturile *3'*, *5'*-internucleotidice naturale se pot forma şi legături *3'*, *2'* şi *5'*, *2'*.

Există unele indicaţii că produsele sintetizate au o configuraţie asemănătoare cu aceea a produşilor naturali. Astfel, polinucleotidele sintetice care au un conţinut pirimidinic au fost degradate de RN-aza pancreatică. Este ştiut că această enzimă acţionează specific numai asupra legăturii *3'*-fosfatice a nucleotidelor pirimidinice ale ARN natural. Pe de altă parte, micrografiile electronice ale acidului poliadenilic demonstrează prezenţa unor filamente lungi asemănătoare cu cele ale ARN natural.

În sfîrşit, rezultatele determinării efectului hipercrom obţinut prin hidroliza lor şi a efectului hipocrom observat la amestecarea poli-A cu poli-U arată că aceşti produşi au conformaţia moleculară a produşilor naturali.

Scanned with OKEN Scanner

Abrams R., Edmonds M., Birwas B. B. (1962), în *Acides ribonucléiques et polyphosphates*, C.N.R.S., Paris, p. 323.
August J. T., Ortiz P. J., Hurwitz J. (1962), J. biol. Chem., **237**, 3 786.
August J. T., Shapiro L., Eoyang Z. (1965), J. mol. Biol., **11**, 257.
Baltimore D. (1964), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **51**, 450.
Baltimore D., Becker J., Darnell J. E. (1964), Science, **143**, 1 034.
Baltimore D., Eggers H. J., Franklin R. M., Tamm I. (1963), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **49**, 843.
Baltimore D., Franklin R. M. (1963), J. biol. Chem., **28**, 3 395.
Beers R. F. Jr. (1956), Nature, **177**, 790.
Beers R. F. Jr. (1958), Arch. Biochem. Biophys., **75**, 497.
Bessman M. J., Lehman I. R., Simms E. S., Kornberg A. (1958), J. biol. Chem., **233**, 171.
Brummond D. O., Ochoa S. (1956), Fed. Proc., **15**, 225.
Brummond D. O., Staehelin M., Ochoa S. (1957), J. biol. Chem., **225**, 835.
Burdon R. H., Smellie R. M. S. (1960), Biochem. J., **76**, 2.
Canellakis E. S. (1957), Biochim. biophys. Acta., **25**, 217.
Canellakis E. S. (1959), Ann. N. Y. Acad. Sci., **81**, 675.
Canellakis E. S., Herbert E. (1960), Biochim. biophys. Acta, **42**, 363.
Chamberlin M., Berg P. (1962), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **48**, 81.
Cramer R. (1961), Angewandte Chem., **73**, 49.
Edmonds M., Abrams R. (1960), J. biol. Chem., **235**, 1 142.
Fenwick M. Z., Erikson E. L., Franklin R. M. (1964), Science, **146**, 525.
Fox C. F., Robinson W. S., Haselkorn R., Weiss G. B. (1964 *a*), J. biol. Chem., **239**, 175.
Fox C. F., Robinson W. S., Haselkorn R., Weiss S. B. (1964 *b*), J. biol. Chem., **239**, 185.
Fox C. P., Weiss S. R. (1962), J. biol. Chem., **239**, 175.
Fresco J. R. (1959), J. mol. Biol., **1**, 106.
Furth J. J., Hurwitz J., Krug R., Alexander M. (1961), J. biol. Chem., **236**, 3 317.
Geiduschek E. P., Moohr J. E., Weiss S. B. (1962), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **48**, 1 078.
Goldthwait D. A. (1959), J. biol. Chem., **234**, 3 245.
Goldthwait D. A., Starr J. L. (1960), J. biol. Chem., **235**, 2 025.
Gomatos P. J., Krug R. M., Tamm I. (1964), J. mol. Biol., **9**, 193.
Gottesman M. E., Canellakis Z. N., Canellakis E. S. (1962), Biochim. biophys. Acta, **61**, 34.
Grunberg-Manago M., Fresco J. R. (1958), Fed. Proc., **17**, 235.
Grunberg-Manago M., Ochoa S. (1955), J. amer. chem. Soc., **77**, 3 165.
Grunberg-Manago M., Wisniewski J. (1957), C. R. Acad. Sci., **245**, 750.
Hancock R. L., Zelis R. F., Show M., Williams-Ashman H. C. (1962), Biochim. biophys. Acta, **55**, 257.
Hecht L. I., Stephenson M. L., Zamecnik P. C. (1959), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **45**, 505.
Hansen P. (1965), Virology, **25**, 523.
Hecht L. I., Zamecnik P. C., Stephenson M. L., Scott J. F. (1958), J. biol. Chem., **233**, 954.
Heidelberger C., Harbers E., Leibman K. C., Tokogi A., Potter V. R. (1956), Biochim. biophys. Acta, **20**, 445.
Hendley D. D., Beers R.F. (1958), Fed. Proc., **17**, 240.
Heppel L. A., Ortiz P. J., Ochoa S. (1957 *a*), J. biol. Chem., **229**, 679.
Heppel L. A., Ortiz P. J., Ochoa S. (1957 *b*), J. biol. Chem., **229**, 695.
Herbert E. (1958), J. biol. Chem., **231**, 975.
Hilmoe R. J., Heppel L. A. (1957), J. amer. chem. Soc., **79**, 4 810.
Hoyashi M., Hoyashi M. N., Spiegelman S. (1963), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **50**, 664.
Huang R. C., Maheshwari M., Bonner J. (1960), Biochem. Biophys. Res. Comm., **3**, 689.
Hurwitz J., Furth J. J., Anders M., Evans A. (1962), J. biol. Chem., **237**, 3 752.
Kelly R. B., Sinsheimer R. L. (1964), J. mol. Biol., **8**, 602.
Kelly R. B., Gould J. L., Sinsheimer R. L. (1965), J. mol. Biol., **11**, 562.
Kaerner H. G., Hoffman-Berling H. (1964), Nature, **202**, 1 012.
Kornberg A., Lehman I. J., Simms E. S. (1956), Fed. Proc., **15**, 291.
Krakow J. S., Ochoa S. (1963), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **49**, 88.
Littauer U. Z., Kornberg A. (1957), J. biol. Chem., **226**, 1 077.

Scanned with OKEN Scanner

Maumur J., Greenspan G. M. (1963), Science, **142**, 387.
Michelson A. M. (1959), J. Chem. Soc., 1 371 şi 3 655.
Mii S., Ochoa S. (1957), Biochim. biophys. Acta, **25**, 445.
Montagnier Z., Sanders F. K. (1963), Nature, **199**, 664.
Nakamoto T., Fox E. F., Weiss S. B. (1964), J. biol. Chem., **239**, 167.
Nakamoto T., Weiss S. B. (1962), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **48**, 880.
Nonoyama M., Ikeda J. (1964), J. mol. Biol., **9**, 763.
Ochoa S. (1958), *Recent progress in microbiology*, în *VII Intern. Congr. for Microbiology*, p. 122.
Ochoa S. (1959), Medicine of Japan, **1**, 857.
Ochoa S., Burma D. P., Krager H., Weill J. D. (1961), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **47**, 570.
Ochoa S., Weismann C., Borst P., Burdon R. H., Billeter M. A. (1964), Fed. Proc., **23**, 1 285.
Olmsted P. S., (1958 *a*), Biochim. biophys. Acta, **27**, 222.
Olmsted P. S. (1958 *b*), Fed. Proc., **17**, 285.
Ortiz P. J., Ochoa S. (1959), J. biol. Chem., **234**, 1 208.
Pons M. (1964), Virology, **24**, 467.
Portocală R., Popa L., Popescu M., Morfei A., Burducea O., Catz Z., Lăcătuș V. (1965), Rev. Roum. Inframicrobiol., **3**, 178.
Preiss J., Diekmann M., Berg P. (1961), J. biol. Chem., **236**, 1 784.
Ralph R. K., Mattews R. E. F., Matus A. J., Mandell H. G. (1965), J. mol. Biol., **11**, 202.
Rich A. (1957), în *The chemical basis of heredity*, Johns Hopkins Press, Baltimore, p. 557.
Rich A., Davies O. R. (1965), J. amer. Chem. Soc., **78**, 3 548.
Rich A., Davies D. R., Crick F. H. C., Watson J. D. (1961), J. mol. Biol., **3**, 71.
Schramm G., Görtsch H., Pollmann W. (1962), în *Acides ribonucléiques et polyphosphates*, C.N.R.S., Paris, p. 25.
Schramm G., Görtsch H., Pollmann W. (1961), Angewandte Chem., **73**, 619.
Schramm G., Wissman H. (1958), Chem. Ber., **91**, 1 073.
Shapiro Z., August J. T. (1965), J. mol. Biol., **112**, 272.
Shipp W., Haselkorn R. (1964), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **52**, 401.
Smellie R. M. S. (1962), în *Acides ribonucléiques et polyphosphates*, C.N.R.S., Paris, p. 343.
Stevens A. (1960), Biochem. Biophys. Res. Comm., **3**, 92.
Tener G. M., Khorana H. G., Markham R., Pol E. H. (1958), J. amer. chem. Soc., **80**, 6 223.
Tobey R. A. (1964), Virology, **199**, 664.
Tocchini-Valentini G. P., Stadolsky M., Aurisicehio A., Sarnat M., Graziosi F., Weiss S. B., Geiduschek E. P. (1963), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **50**, 935.
Venkataraman P. R., Mahler H. R. (1963), J. biol. Chem., **238**, 1 058.
Weiss S. B. (1960), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **21**, 1 020.
Weiss S. B., (1962), Fed. Proc., **21**, 120.
Weiss S. B., Gladstone L. (1959), J. amer. chem. Soc., **81**, 4 118.
Weiss S. B., Nakamoto T. (1961), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **47**, 1 400.
Weissman C., Borst P. (1963), Science, **142**, 1 118.
Weissman C., Borst P., Burdon R. H., Billeter M. A., Ochoa S. (1964), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **52**, 401.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 6

ACIZII RIBONUCLEICI CELULARI

Principalele tipuri de acizi ribonucleici

Acizii ribonucleici solubili. Hoagland şi colab. (1956) au pus în evidenţă în fracţiunea solubilă a extractelor citoplasmatice ale ficatului de şobolan un ARN cu o greutate moleculară mică. După modul cum a fost pus în evidenţă, descoperitorii săi l-au denumit acid ribonucleic *solubil* (ARN-*S*). Autorii au demonstrat că acest acid ribonucleic are proprietatea de a se lega de acizii aminaţi şi are un rol important în sinteza proteinelor. Ulterior s-au identificat şi purificat din alte surse ARN cu proprietăţi similare. Cu aceste ocazii s-a observat că din punctul de vedere al reacţiei lor cu acizii aminaţi există mai multe tipuri de ARN-*S* : unii sînt specifici faţă de tirozină, alţii faţă de alanină etc. Cu toate că pînă în prezent nu s-a putut demonstra specificitatea acizilor ribonucleici solubili faţă de toţi acizii aminaţi, se consideră că există cel puţin 20 de ARN-*S* diferiţi, astfel că fiecare acid aminat care intră în mod obişnuit în compoziţia unei proteine ar reacţiona specific cu un anumit ARN-*S*. După Allen şi colab. (1960 *a*) numai o parte din ARN-*S*, din ficatul de cobai, are proprietatea de a se lega de acizii aminaţi. Fracţiunea activă a ARN-*S*, care participă direct în transferul acizilor aminaţi în procesul de sinteză a proteinelor, a fost denumită de aceşti autori „acizi ribonucleici de *transfer* ai acizilor aminaţi". ARN-*S* formează aproximativ 10—20% din cantitatea totală a ARN celular.

Greutatea moleculară a unor ARN-*S* de diferite origini, a fost determinată de Brown şi colab. (1962) prin ultracentrifugare, a condus la valori cuprinse între 27 000 şi 28 000 (tabelul 14).

Aceste valori demonstrează că lungimea lanţului molecular este de aproximativ 85 de nucleotide.

Pe de altă parte, analizele efectuate de Cantoni (1962) asupra diferitelor fracţiuni de ARN-*S*, extrase din ficatul de iepure şi care au fost specifice pentru transferul valinei, leucinei şi prolinei, au arătat valori ale coeficientului de sedimentare apropiate de cele obţinute de Brown (1962). Astfel, ARN-*S* specific leucinei a prezentat valoarea de 4,4 ± 0,6 S, cel specific prolinei de 4,2 ± 0,75 şi ultimul, specific valinei

de 4,0 ± 0,75. Întrucît între diferiţii ARN-*S*, specifici pentru transferul unui acid aminat dat, nu s-au găsit diferenţe semnificative ale greutăţii lor moleculare s-a dedus că specificitatea biologică a ARN-*S* a acizilor

Tabelul 14

Greutatea moleculară a unor acizi ribonucleici solubili
(după Brown şi colab., 1962)

Sursa	Greutatea moleculară ±1 000	Constanta de sedimentare (Svedbergi)
Ficat de viţel	27 500	3,85
E. coli	28 000	3,92
Drojdie	28 000	4,05
Ficat de păstrăv		3,83
Boabe de mazăre		3,76
Tetrahymena pyr		3,92
Larve	27 000	3,90

aminaţi nu se datoreşte diferenţelor existente între greutăţile lor moleculare. O altă observaţie, deosebit de importantă, care a rezultat din analiza greutăţilor moleculare, a fost aceea că ARN-*S* de diferite origini conţin aproximativ acelaşi număr de nucleotide. Mai mult chiar, s-a putut demonstra că ARN-*S* specific transferului tirozinei, extras şi purificat din drojdie, are compoziţia în nucleotide similară cu aceea a aceluiaşi ARN extras din *E. coli*. Este interesant de menţionat că în ambele cazuri conţinutul în nucleotide a fost semnificativ diferit de acela al preparatelor originale de ARN-*S* din care s-a făcut fracţionarea.

Compoziţia în nucleotide, precum şi greutatea moleculară aproape identică, găsită pentru ARN-*S* de diferite origini, a generat întrebarea : prin ce se deosebesc între ei acizii ribonucleici solubili, specifici faţă de un acid aminat dat? Răspunsul la această întrebare a devenit şi mai greu de aflat după ce diferite experienţe au demonstrat că ARN-*S* de diferite origini au aceeaşi secvenţă a celor trei nucleotide terminale şi anume : pCpCpA.

O primă informaţie referitoare la această întrebare s-a putut obţine în urma analizelor efectuate de Berg şi Lagerkvist (1962). Aceştia au reuşit să stabilească că ARN-*S* din *E. coli* au secvenţa nucleotidelor, anterioară grupei terminale pCpCpA, eterogenă. Această eterogenitate este evidenţiată de natura bazelor care se găsesc în poziţia a 4-a, a 5-a şi a 6-a subterminală. Aceleaşi experienţe au arătat că secvenţa nucleotidelor pentru ARN-*S*, specifică leucinei, diferă de aceea a ARN-*S* care acceptă izoleucina. Experienţele efectuate în acelaşi scop de Lagerkvist şi Berg (1962), Berg şi colab. (1962) au reuşit să stabilească 11 secvenţe diferite de nucleotide adiacente secvenţei terminale pCpCpA. În particular, ei au determinat că ARN-*S* care transferă izoleucina se

termină prin secvenţa pGpC (UpC) pApCpCpA şi că există două tipuri de ARN-*S* care transferă leucina: unul care se termină prin pGpCpApCpCpA şi al doilea prin pGpUpApCpCpA.

După cum s-a mai arătat, se consideră azi că preparatele de ARN-*T* sînt constituiţi dintr-un amestec de cel puţin 20 de ARN diferiţi, fiecare din aceştia fiind capabil de a se combina cu unul din cei 20 de acizi aminaţi existenţi în mod obişnuit într-o proteină.

La această concluzie au condus lucrările lui Hoagland şi colab. (1958), Berg şi Ofengand (1958), Weiss şi colab. (1958), Lipmann şi colab. (1959), Zilling şi colab. (1960), Allen şi colab. (1960 *b*) etc.

Rezultatele experimentale au arătat că o anumită cantitate de ARN-*S* fixează întotdeauna o cantitate determinată dintr-un acid aminat dat. Dar, ceea ce este foarte important este faptul că această cantitate este diferită de la un acid aminat la altul. Mai mult decît atît, s-a putut demonstra că proporţia unui acid aminat legat este independentă de cantitatea altor acizi aminaţi anterior legaţi de ARN-*S*.

S-a dedus de aici că acizii aminaţi nu intră în competiţie între ei pentru un ARN-*S* oarecare. Totodată, aceste rezultate presupun că: *a*) ori există pentru fiecare acid aminat un anumit ARN-*S*; *b*) ori, un ARN-*S* fixează mai mulţi acizi aminaţi în diferite puncte ale moleculei sale.

Îndepărtarea nucleotidului terminal al ARN-*S* prin tratamentul cu fosfodiesteraza din veninul de şarpe (Preiss şi colab., 1959) sau prin pirofosforoliză (Hecht şi colab., 1959) sau distrugerea hidroxililor ribozei nucleotidului terminal cu acid periodic (Preiss şi colab., 1959) au determinat pierderea capacităţii ARN-*S* de a se cupla cu acizii aminaţi. Acestea au permis să se considere că există un singur loc de fixare a acizilor aminaţi pe ARN-*S*, care a fost identificat a fi hidroxilul *2'* sau *3'* al ribozei din nucleotidul terminal adenilic al ARN-*S*. Acidul aminat se fixează prin gruparea sa α-carboxilică de hidroxilul ribozei formîndu-se astfel între cei doi compuşi o legătură esterică.

În acest fel, rezultă că alternativa a doua conform căreia acizii aminaţi s-ar fixa în mai multe puncte de ARN-*S* este improbabilă.

Pe baza lucrărilor citate mai sus s-a ajuns la concluzia că pentru fiecare acid aminat există un ARN-*S* specific.

Problema specificităţii ARN-*S* nu a fost încă elucidată. Ea este atribuită secvenţei specifice a nucleotidelor din lanţurile lor moleculare.

Pînă în momentul de faţă se cunoaşte doar secvenţa totală a unui singur ARN-*S*, cel de transfer al alaninei (Holley şi colab., 1965). Cercetările ulterioare care vor reuşi să descifreze structura şi a celorlalţi ARN-*S* (şi înalt polimerizaţi) vor fi în măsură să dea un răspuns direct naturii specificităţii ARN.

Rolul şi funcţia ARN-*S* în sinteza proteinelor sînt descrise în capitolul al VIII-lea.

Scanned with OKEN Scanner

Acizii ribonucleici ribozomali. Cercetările lui Hall şi Doty (1959) au arătat că ribozomii bacterieni conţin acizi ribonucleici care prin centrifugare se separă în două componente distincte : una care prezintă coeficientul de sedimentare de 18 *S* şi a doua de 28 *S*. Ulterior, Kurland (1960), confirmînd rezultatele referitoare la eterogenitatea ARN ribozomali, a arătat că ribozomii din *E. coli* conţin atît molecule de ARN cu greutate moleculară de $5{,}6 \times 10^5$ (16 *S*), cît şi molecule cu o greutate moleculară de $1{,}1 \times 10^6$ (23 *S*). După Kurland (1960) şi Watson (1963), ARN ribozomali cu greutatea moleculară mai mică (16 *S*) provin din ribozomii care au coeficientul de sedimentare de 30 *S*, în timp ce ribozomii de 50 *S* pot conţine fie o moleculă de ARN cu greutatea moleculară de $1{,}1 \times 10^6$, fie două molecule de ARN cu greutatea moleculară de $5{,}6 \times 10^5$ (două molecule de 16 *S*) (fig. 99).

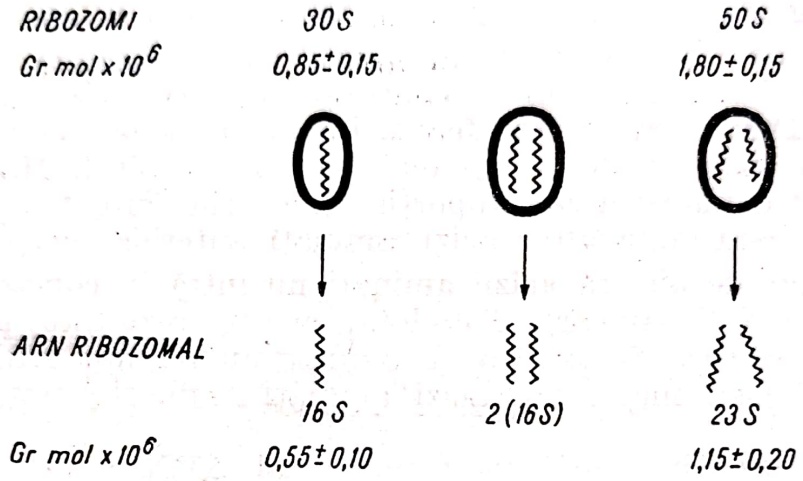


Fig. 99. — Greutăţile moleculare ale acizilor ribonucleici proveniţi din diferiţi ribozomi (după Kurland, 1960).

Aceşti ARN există în celule sub formă de particule nucleoproteice şi reprezintă aproximativ jumătate din greutatea ribozomilor.

Pe de altă parte, Green şi Hall (1961) susţin că ribozomii 50 *S* care sînt subunităţi ai ribozomilor 70 *S* conţin aproape exclusiv o moleculă mare de ARN (23 *S*), în timp ce ribozomi „nativi" de 50 *S*, care nu sînt incluşi în ribozomi de 70 *S* şi există în mod independent în celule, conţin două molecule mici de ARN de 16 *S*.

Valorile obţinute în urma determinării greutăţii moleculare a unor ARN ribozomali de diferite origini l-au condus pe Spirin (1962 şi 1963) la o serie de observaţii importante privind caracteristicile lor (tabelul 15).

Din aceste rezultate s-a dedus că :

a) Cele două componente ale ARN ribozomal au greutăţile moleculare sub 2×10^6, cît are un ARN viral.

b) Componenta cu greutatea moleculară mai mare a ARN ribozomal este de 2 pînă la 3,5 ori mai grea decît componenta mai mică.

Scanned with OKEN Scanner

c) Greutatea moleculară a componentei omologe extrasă din diferite celule variază în funcţie de originea celulelor.

d) Comparînd greutăţile moleculare ale ARN de diferite origini, se poate constata că întotdeauna atunci cînd componenta cu greutatea moleculară cea mai mare prezintă valorile maxime, componenta mai mică are valorile minime.

e) Suma greutăţii moleculare a celor două componente de ARN este identică pentru ARN de diferite origini (bacteriană, animală şi vegetală), fiind de aproximativ $1{,}7 \times 10^6$.

Tabelul 15

Coeficienţii de sedimentare şi greutăţile moleculare ai unor acizi ribonucleici înalt polimerizaţi celulari* (după Spirin, 1962)

Sursa de acizi ribonucleici	S^0_{20}	M	$M_1 : M_2$	$M_1 + M_2$
E. coli	23,0 16,7	$1{,}12 \times 10^6$ $0{,}56 \times 10^6$	2 : 1	$1{,}7 \times 10^6$
Iepure	24,5 14,5	$1{,}27 \times 10^6$ $0{,}43 \times 10^6$	3 : 1 3 : 1	$1{,}7 \times 10^6$ $1{,}7 \times 10^6$
Mazăre	25,1 13,9	$1{,}34 \times 10^6$ $0{,}39 \times 10^6$	3,5 : 1	$1{,}7 \times 10^6$

* Valorile coeficienţilor de sedimentare au fost extrapolate pentru o diluţie infinită, iar greutatea moleculară s-a calculat din ecuaţia empirică: $M = 1550 \times S^{2,0}$, pentru forţa ionică de 0,1, la 20° şi pH 7.

În urma datelor obţinute, Spirin (1963) presupune că într-o celulă se produc în mod normal ARN cu greutatea moleculară de aproximativ 2×10^6. Întotdeauna se sintetizează precursori ai ARN ribozomali care au greutatea moleculară de 2×10^6 şi apoi se divid în două părţi inegale, înainte, în timpul, sau după formarea particulelor ribozomale. O altă concluzie deosebit de importantă este aceea că, indiferent de specie şi organism, conţinutul unui ribozom în ARN este apropiat de acela al unei particule virale.

O problemă deosebit de controversată a fost cea a continuităţii lanţului macromolecular al ARN ribozomali. Hall şi Doty (1959), Helmkamp şi Ts'o (1961), Aronson şi McCarthy (1961) şi alţii au susţinut că ARN ribozomali macromoleculari sînt constituiţi din mai multe subunităţi moleculare scurte, care sînt menţinute împreună prin legături de hidrogen. Prin acţiunea unor agenţi fizici sau chimici, legăturile de hidrogen se desfac obţinîndu-se componentele reale de ARN ribozomal care au greutăţi moleculare de 120 000 (Hall şi Doty) sau 30 000 (Aronson şi McCarthy).

Spre deosebire de părerea autorilor mai sus citaţi şi care a fost bazată pe scăderea bruscă şi ireversibilă a viscozităţii specifice şi a coeficientului de sedimentare după încălzirea ARN ribozomali, experienţele lui

Scanned with OKEN Scanner

Spirin (1962) au demonstrat fapte contrarii. Astfel, încălzirea unor ARN ribozomali înalt polimerizaţi a fost însoţită de o creştere bruscă a vîscozităţii într-un domeniu restrîns de temperatură. Totodată, modificările observate au fost reversibile. După cum arată Spirin (1962), creşterea evidentă a vîscozităţii specifice a ARN ribozomal în timpul încălzirii este o dovadă că moleculele de ARN sînt înalt polimerizate şi că în urma acestui tratament ele se desfăşoară. Pe de altă parte, reversibilitatea modificărilor observate demonstrează că în acest caz nu are loc o disociere a moleculelor în subunităţi moleculare mici, ci mai degrabă se datoreşte schimbărilor suferite de macromolecule. Prin urmare, aceste experienţe dovedesc că ARN ribozomali se comportă ca lanţuri macromoleculare continue. Informaţii similare au fost obţinute şi prin analiza morfologică realizată pe imaginile electronomicroscopice. Lungimea componentei mai mari a ARN ribozomal observată a fost de 18 000 Å, ceea ce corespunde unei greutăţi moleculare de aproximativ $1{,}1 \times 10^6$.

Ideea continuităţii lanţului macromolecular al ARN ribozomali este astăzi admisă de majoritatea cercetătorilor. Disocierea ARN ribozomal în subunităţi este considerată ca o consecinţă a acţiunii nucleazelor, prezente în preparatele întrebuinţate de unii cercetători. Boedtker şi colab. (1962), Cox şi Arnstein (1963) susţin şi ei ideea continuităţii lanţului macromolecular de ARN ribozomal. Componenta cu greutate moleculară mai mică ar apărea datorită alterărilor intervenite în timpul izolării.

În general, ribozomii conţin 80—90 % din cantitatea totală de ARN celulari (Gros şi colab., 1962). Încă mai de mult s-a pus problema rolului pe care aceşti ARN îl au în interiorul celulei. Astăzi există numeroase dovezi că sinteza proteinelor are loc cu ajutorul ribozomilor, ceea ce a determinat să se presupună că ARN ribozomali au rolul de matrice pentru sinteza proteinelor (Watson, 1963). Unul din mecanismele cele mai des invocate pentru a explica transferul informaţiei în cursul sintezei lanţurilor polipeptidice a fost acela după care fiecare proteină este „determinată" de un ribozom particular, care primeşte informaţia de la ARN. După acest principiu o anumită proteină corespunde unui ribozom specific, iar ARN ribozomal serveşte ca tipar pentru a ordona secvenţa aminoacizilor în această proteină. Părerea aceasta a fost contrazisă însă de o serie de fapte experimentale care au stabilit că ARN ribozomali sînt stabili din punct de vedere metabolic (Riley şi colab., 1960).

Demonstraţia stabilităţii ARN ribozomali a fost făcută şi de Davern şi Meselson (1960). Aceşti autori au cultivat bacterii într-un mediu ce conţinea C^{13} şi N^{15}. După un anumit timp bacteriile au fost transferate şi cultivate timp de mai multe generaţii într-un al doilea mediu, care cuprindea C^{12} şi N^{14}. Separarea ARN ribozomali, în gradienţi de formiat de cesiu, a demonstrat că cel puţin timp de două generaţii moleculele de ARN marcate cu C^{13} şi N^{15} au rămas intacte.

Brenner şi colab. (1961) aduc alte dovezi în favoarea stabilităţii ribozomilor şi implicit a ARN. Ei au cultivat *E. coli* într-un mediu cu

Scanned with OKEN Scanner

izotopi C^{13} şi N^{15} şi au obţinut o generaţie de celule cu ribozomi („grei") marcaţi izotopic. Generaţia marcată a fost apoi infectată cu bacteriofagul T_4 şi după aceasta trecută într-un mediu normal care conţinea C^{12} şi N^{14}.

În urma transferului era de aşteptat ca ribozomii nou formaţi să fie mai uşori decît cei marcaţi.

În continuare, ei au introdus în mediul de cultură normal P^{32} pentru a marca ARN-*mesager*, produs de ADN fagic.

Rezultatele ultracentrifugării în gradient de CsCl şi zaharoză au demonstrat că maximul radioactivităţii P^{32}, care aparţinea ARN-*mesager* fagic format în urma infecţiei, era situat în zona ribozomilor „grei" marcaţi cu C^{13} şi N^{15}.

În acest fel s-a demonstrat pe de o parte că în timpul infectării bacteriilor cu fagi nu se sintetizează ribozomi noi şi ca atare ei sînt stabili, iar pe de alta că ARN nou sintetizat în urma infecţiei se leagă de ribozomii preexistenţi.

Pînă în prezent rolul ARN ribozomali n-a fost încă clarificat. Conţinutul mare în celulă şi rolul fundamental pe care îl au ribozomii în sinteza proteinelor presupun totuşi că ARN ribozomal are şi alte funcţiuni, care rămîn a fi precizate în viitor.

Acizii ribonucleici mesageri. Acest tip de ARN, puşi în evidenţă cu aproximativ zece ani în urmă, se găsesc în celule, într-o proporţie mică. Rolul lor fundamental este acela de a transmite informaţia genetică de la ADN la locul sintezei proteinelor, în ribozomii citoplasmei. Prima observaţie privind existenţa unor astfel de ARN a fost făcută de Hershey (1953). El a observat că în urma infectării bacteriilor cu fagi, sinteza ARN este oprită, dar că se remarcă existenţa unei fracţiuni mici de ARN extrem de instabile.

Volkin şi Astrachan (1956) au reuşit să precizeze natura fracţiunii de ARN instabile observate de Hershey. Infectarea celulelor de *E. coli* cu bacteriofagi T_2 şi T_7 a permis acestor autori să stabilească că fracţiunea instabilă de ARN care apare în urma infecţiei este de aproximativ 3% din cantitatea totală de ARN celulari. În acelaşi timp, s-a remarcat că simultan cu sinteza sa acest ARN suferă un proces de dezintegrare. Dar, cea mai importantă descoperire făcută de Volkin şi Astrachan a fost aceea prin care ei au pus în evidenţă asemănarea dintre compoziţia în nucleotide a fracţiunii de ARN instabil şi aceea a ADN din fagul care infectează bacteria.

În acest scop, după infectarea cu fagi, bacteriile au fost incubate diferite perioade de timp în prezenţa P^{32}. ARN extras din bacteriile infectate a fost apoi analizat în privinţa conţinutului în P^{32} al nucleotidelor sale. Rezultatele obţinute au demonstrat că ARN metabolic instabil, care apare în urma infectării bacteriilor cu fagi, are compoziţia în baze identică cu aceea a ADN fagic.

Scanned with OKEN Scanner

Ulterior, Nomura şi colab. (1960), Brenner şi colab. (1961) au arătat că infectarea bacteriilor cu fagi împiedică sinteza ribozomilor noi şi că ARN instabil, singurul care se sintetizează în aceste condiţii, se combină cu ribozomii preexistenţi, orientînd funcţiunea lor spre sinteza proteinelor specifice fagului.

Generalizarea concepţiei existenţei unui ARN instabil chiar în celulele neinfectate, compus cu caracteristici identice celui indus de infecţia cu fag, a fost propusă de Gros şi colab. (1960). Aceşti autori au dovedit că şi celulele normale de *E. coli* posedă un ARN metabolic instabil, care reprezintă 3% din cantitatea totală de ARN celular. Această fracţiune a fost pusă în evidenţă prin marcare de scurtă durată cu ajutorul unui precursor radioactiv, iar caracteristicile sale de sedimentare şi metabolice au fost identice cu cele ale ARN elaborat după infectare. Aceste observaţii i-au determinat pe Gros şi colab. (1960) să emită ipoteza existenţei unui ARN „mesager", prezent în toate celulele — normale şi infectate — şi care are rolul principal de a transmite informaţia genetică pentru sinteza proteinelor de la ADN la ribozomi.

Instabilitatea metabolică a ARN mesageri a făcut ca punerea lor în evidenţă să nu fie posibilă decît prin tehnica de marcare izotopică, timp de 0,5—5 minute. În acest fel, „marca" este încorporată numai în fracţiunile cu un metabolism foarte activ. În cursul unor cercetări în care s-a întrebuinţat actinomicină D ca inhibant al sintezei acestui tip de ARN, s-a stabilit că în celulele de *B. subtilis* timpul său de înjumătăţire este de 2 minute (Levinthal şi colab., 1962). În această scurtă perioadă de timp, molecula de ARN-*M* poate funcţiona ca model pentru formarea a 10—20 de molecule proteice.

Primele măsurători ale greutăţii moleculare a ARN-*M* au dat valori scăzute. Determinări mai recente au dovedit eterogenitatea acestor ARN, fracţiunile prezentînd valori cuprinse între 30 000 şi 2×10^6 (coeficienţi de sedimentare între 4 şi 30 *S*) (Ishihama şi colab., 1962; Monier şi colab., 1962).

Compoziţia în nucleotide a ARN-*M* din celulele normale de *E. coli* este apropiată de aceea a ADN propriu bacteriei, în timp ce ARN-*M* din celulele infectate are o compoziţie similară cu aceea a ADN din fag (tabelul 16). Această ultimă constatare este în concordanţă cu observaţia lui Volkin şi Astrachan (1956).

Rezultatele expuse mai sus sînt compatibile cu ipoteza după care ARN-*M* reflectă direct compoziţia în nucleotide a ADN care serveşte ca matrice pentru sinteza sa.

Hall şi Spiegelman (1961) au demonstrat experimental posibilitatea transmiterii informaţiei genetice de la ADN la ARN-*M*. Plecînd de la presupunerea că ARN-*M* monocatenar poate forma hibrizi cu una din catenele de ADN pe care s-a format numai dacă secvenţa bazelor celor doi acizi nucleici sînt complimentare, ei au observat că, într-adevăr, numai ARN indus de infecţia cu T_2 formează elicea dublă a ADN de T_2.

Încercările de hibridare a ARN de T_2 cu alţi ADN nu au determinat formarea de hibrizi. Datele obţinute de Hall şi Spiegelman (1961) au demonstrat astfel că moleculele de ARN sintetizate în urma infectării bacteriilor cu fagi au proprietatea bine definită de a forma complecşi de ADN de fag. Faptul că aceşti complecşi se formează numai între ARN-*M*

Tabelul 16

Compoziţia în baze a acizilor nucleici ai celulelor de *E.coli* normale şi infectate cu bacteriofagul T_2 (după Gros şi colab., 1962)

Sursa	Molecule pentru 100 de moli de nucleotide identificate					Raportul $\frac{\text{purine}}{\text{pirimidine}}$	Raportul $\frac{A + T (U)}{G + C}$
	A	C	G	U (T)	Baze rare		
Celule normale							
ADN	24—25	25—26	26—27	24—25	—	0,96—1,04	0,92—1,0
ARN *ribozomal*	25,2	21,6	31,5	21,7	—	1,30	0,88
ARN *mesager*	25,1	24,1	27,1	33,7	—	1,09	0,95
ARN *solubil*	20,3	28,9	32,1	15,0	3,7	1,12	0,64
Celule infectate							
ADN de T_2	32	17	18	32	—	0,98	1,83
ARN *mesager*	31	17	20	31	—	1,06	1,68

indus de T_2 şi ADN de T_2, reflectă corespondenţa existentă între structura celor doi acizi nucleici. Specificitatea structurală a celor două catene polinucleotidice rezidă, după toate probabilităţile, în secvenţa nucleotidelor din lanţ. De aici s-a dedus un fapt de mare importanţă, anume că între cele două catene (ARN-*M* şi ADN-T_2) trebuie să existe o complementaritate perfectă, identică cu aceea care există în cunoscuta formulă structurală propusă de Watson şi Crick. Complementaritatea secvenţei dintre ARN-*M* şi ADN-T_2 dovedeşte astfel posibilitatea transmiterii informaţiei genetice de la ADN la ARN. Totodată, aceste experienţe demonstrează posibilitatea sintezei unor ARN cu secvenţa nucleotidelor complementară unui ADN. Aceşti ARN, care astăzi sînt bine definiţi ca *acizi ribonucleici mesageri*, realizează sinteza dirijată a proteinelor după modelul ADN. Prezenţa ARN mesageri în celulele animale şi funcţia mesageră a ARN virali şi sintetici este discutată în capitolul al VIII-lea.

Acizii ribonucleici virali. Acizii ribonucleici virali sînt trataţi într-un capitol special. În cele ce urmează ne vom rezuma să prezentăm numai unele aspecte generale ale structurii şi funcţiei lor.

Una dintre componentele principale ale virusurilor este acidul nucleic. Cu toate că în unele cazuri reprezintă o mică porţiune din cantitatea totală a particulei virale (tabelul 17), acidul nucleic viral constituie mate-

rialul „genetic" al virusurilor. Spre deosebire de orice celulă care conţine întreaga informaţie genetică înscrisă în moleculele de ADN, virusurile care conţin numai ARN îşi transmit caracterele prin acest acid nucleic. Pentru majoritatea virusurilor se consideră că în interiorul capsidei există o singură moleculă de acid nucleic, ARN sau ADN (Wildy şi Horne, 1963).

Greutatea moleculară a ARN virali este foarte ridicată. Rezultatele lui Gierer (1957) arată că pentru VMT această valoare este de 2×10^6. O cifră asemănătoare (2×10^6) a fost obţinută şi pentru ARN extras din virusul icterului napilor (Klug şi Caspar, 1960).

Tabelul 17

Compoziţia chimică a unor virusuri ce conţin ARN (după datele lui Jamafuji, 1964 şi Wildy şi Horne, 1963)

Virusul	Proteine (%)	ARN (%)	ADN (%)	Lipide (%)	Hidraţi de carbon (%)
VMT	94	6	—	—	—
Poliomielitic	65—70	25—30	—	—	—
Gripal	60—70	1	—	25	3—8
Herpetic	70	0,1	6,5	22	1,6

Virusurile encefalitelor, ca şi cel al febrei aftoase conţin ARN cu greutăţi moleculare de acelaşi ordin de mărime (Spirin, 1963). Aceste rezultate experimentale sînt în bună concordanţă cu presupunerea făcută de Frisch-Niggemeyer (1956) conform căreia, în cazul în care tot ARN dintr-o particulă virală este reprezentat de o singură moleculă, atunci greutatea ei moleculară trebuie să fie de aproximativ 2×10^6.

Structura moleculei de ARN în interiorul particulei virale este în general puţin cunoscută. În cazul VMT, particulele virale, care au forma unui cilindru cu diametrul de 170 Å şi lungimea de 3 000 Å, conţin ARN sub formă monocatenară, înfăşurat elicoidal în jurul axei cilindrului. Raza elicei este de 40 Å, cu o spiră care are pasul de 5,1 Å şi care conţine aproximativ 49 de nucleotide (fig. 100). Numărul total al nucleotidelor este de 6 400, iar lungimea întregii molecule întinse ar avea aproximativ 5 μ. ARN al VMT este înconjurat de 2 000 de subunităţi proteice, fiecare cu o greutate moleculară de 17 500. O subunitate proteică conţine 158 de aminoacizi a căror secvenţă exactă nu este încă cunoscută (Tsugita şi colab., 1960).

În marea majoritate a cazurilor, virusurile conţin ARN monocatenar cu greutatea moleculară arătată mai sus. Există însă şi virusuri care conţin ARN bicatenar, cum este cazul reovirusurilor. Este important faptul că în acest caz greutatea moleculară s-a găsit a fi $10{,}2 \times 10^6$ (Gomatos şi Tamm, 1963). Recent s-a demonstrat că, în timpul infectării unor celule

cu virusuri ce conţin ARN monocatenar, apare la un moment dat un ARN bicatenar, care reprezintă forma replicativă a ARN viral, monocatenar.

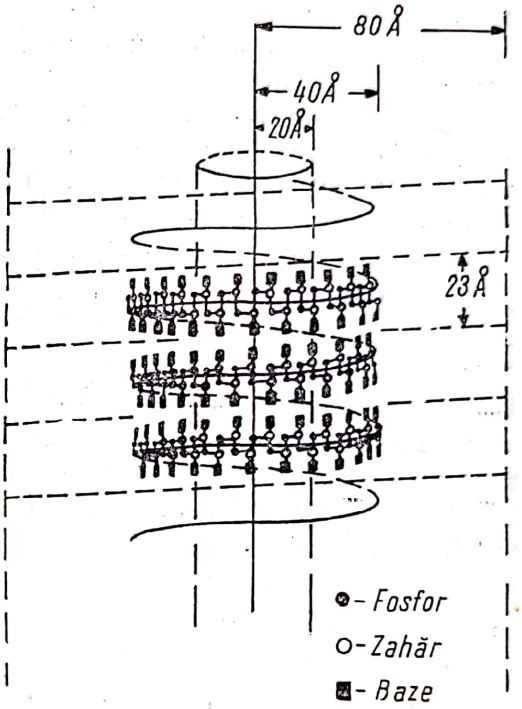


Fig. 100. — Reprezentarea schematică a acidului ribonucleic monocatenar, în interiorul virusului mozaicului tutunului (după Ginoza, 1958).

Acizii ribonucleici în procesul tumoral. Faptul că unele tumori umane sau animale sînt provocate de virusuri a fost recunoscut de vreme îndelungată, ceea ce l-a determinat pe Borrel (1903) să-şi formuleze ipoteza asupra naturii virale a cancerului. Dintre virusurile care conţin ARN, cel mai reprezentativ este cel descris de Rous. Inoculat la galinacee, acest virus determină apariţia unui sarcom, care poate fi trecut în serie la această specie animală.

Încurajaţi de rezultatele impresionante obţinute în transmiterea unor viroze cu ajutorul acizilor nucleici, cercetătorii au încercat şi transmiterea caracterului oncogen cu acizi nucleici izolaţi din virusurile tumorale. Pînă în prezent însă toate tentativele de provocare a carcinomului Rous cu ARN izolat din acest virus au dat rezultate negative.

În cazul leucemiilor murine, inocularea acizilor nucleici (atît ARN cît şi ADN) extraşi din organele şoarecilor din linia AKR, provoca apariţia unui proces leucemic şoarecilor din linii diferite (Hays şi colab., 1957).

Latarjet şi colab. (1958 şi 1960) extrag din ţesuturi leucemice ale şoarecilor AKR un amestec de acizi nucleici care se dovedeşte a fi leucemogen pentru şoarecii din liniile AKR şi CH_3.

Bielka şi Graffi (1959) studiază comparativ activitatea ARN şi ADN izolaţi din ţesuturile leucemice ale şoarecelui. În urma acestor cer-

cetări, autorii constată că, în timp ce toate încercările efectuate cu ADN au rămas negative, inocularea ARN a provocat leucemii într-un procent de 10,3 %. Este interesant de subliniat că ARN tratat, înainte de inoculare, cu RN-ază a fost inactivat.

Extracte care conţineau ARN preparate din ganglioni limfatici ai unor oameni morţi de leucemie au provocat apariţia de mezotelioame şi de alte tumori la şoarecele nou-născut din linia CH_3, sau la anumite linii de hibrizi (Lacour şi colab., 1960). Tumorile astfel provocate erau transplantabile altor şoareci ; de asemenea, ARN extras din aceste tumori reuşea să determine apariţia tumorilor la şoareci nou-născuţi sau tineri.

În cercetări îndreptate spre acelaşi ţel, Carvalho (1960) extrage un ARN din material tumoral uman, cu ajutorul metodei cu fluorocarbon. Acest produs inoculat pe culturi amniotice umane provoacă un efect citopatic care se intensifică în trecerile ulterioare. Inocularea acestor culturi şoarecilor din linia Swiss şi DBA/2 dădea leucoză şi tumori pleiomorfe.

Lacour şi Harel (1962) reuşesc să provoace în 17 % din cazuri leziuni neoplazice de tip leucemic la pui de găină inoculaţi cu ARN extras din ţesuturi eritroblastice. Produsul s-a dovedit a fi sensibil la acţiunea degradantă a RN-azei.

Localizarea intracelulară a acizilor ribonucleici

Este cunoscut astăzi că acizii nucleici sînt prezenţi în toate celulele, indiferent de specia sau originea lor. Rolul lor în procesele vitale ale celulelor animale sau vegetale este necontenit precizat prin descoperirea de noi proprietăţi caracteristice. Pe zi ce trece se găsesc noi tipuri de acizi nucleici, cu roluri speciale în procesele de multiplicare celulară, de transmitere a caracterelor ereditare, de dirijare a metabolismelor sau de sinteză a unor compuşi esenţiali.

Prezenţa acizilor nucleici în interiorul celulei a putut fi pusă în evidenţă şi interpretată între anii 1930 şi 1941. Este curios faptul că în primele cercetări s-a considerat că în timp ce acidul ribonucleic este prezent numai în citoplasma celulelor vegetale, cel dezoxiribonucleic se poate izola din nucleii celulelor animale, şi anume în special din timus. De aici, cele două denumiri, astăzi complet abandonate, de acid zimonucleic dat primului şi acid timonucleic, celui de-al doilea. Cercetările ulterioare, sistematice şi mult mai precise, au dovedit că ambii acizi nucleici există, pe de o parte în toate celulele, indiferent de specie sau origine, iar pe de altă parte că ei se pot găsi în ambele componente celulare : nucleu şi citoplasmă.

Scanned with OKEN Scanner

În ceea ce privește ARN, a fost pus în evidență în interiorul celulei, în același timp, de doi cercetători, prin două metode tehnice diferite. În adevăr, Caspersson (1941), cu ajutorul microscopiei în lumină ultravioletă, și Brachet (1941), prin tehnici speciale de citochimie, reușesc să pună în evidență ARN atît în citoplasmă cît și în nucleol. Concluzia la care cei doi autori ajung în urma acestor cercetări preliminare este că ARN joacă un rol esențial în procesele de sinteză proteică intracelulară.

Cercetări ulterioare, avînd ca punct de plecare descoperirea făcută simultan de acești doi autori, au avut scopul de a localiza ARN în interiorul celulei și de a-i preciza funcțiunile multiple. Astăzi se știe că acest compus face parte intrinsecă din unele formațiuni morfologice identificate, cărora le conferă proprietăți fizico-chimice speciale. Puse în evidență și studiate cu ajutorul microscopului electronic sau cu cel optic, după tehnici speciale de citochimie, ele au fost analizate cu metode speciale precizîndu-se astfel pe lîngă morfologie, compoziția lor chimică.

Repartiția intracelulară a ARN este inegală, deoarece majoritatea cantitativă a sa este acumulată în citoplasmă. Pentru acest motiv, descrierea noastră va începe cu această porțiune celulară, în care ribozomii cuprind cantități importante de ARN.

În citoplasmă, ARN este repartizat între formațiunile morfologic distincte și sucul citoplasmic. Dintre primele, ribozomii sînt formațiunile cele mai bogate în ARN, deoarece conțin aproximativ 80 % din întreaga cantitate existentă în celulă.

Microzomii. Aceste formațiuni au fost descoperite de către Claude (1943) în ultracentrifugatul trituratului celular, după ce nucleii, resturile celulare și mitocondriile au fost sedimentate. După acest autor, microzomii reprezintă 20 — 25 % din țesutul hepatic deshidratat. Morfologic, microzomii se prezintă sub formă de granule cu dimensiuni cuprinse între 50 și 200 mμ. Din punct de vedere chimic, analizele efectuate au arătat că ei conțin o mare cantitate de ARN.

Găsiți mai întîi în celula hepatică de Claude, microzomii au fost ulterior descriși de Brachet și Jeener (1944) și în alte tipuri de celule, atît de origine animală cît și vegetală.

Ulterior, Porter (1954 și 1955) descrie și studiază, cu ajutorul microscopului electronic, în interiorul citoplasmei, formațiuni tubulare care formează o tramă fină vacuolară. Este vorba de ergastoplasma descoperită în 1897 de Garnier și Bouin (1897). Porter numește „reticul endoplasmic" această structură citoplasmică și o descrie ca fiind compusă din trabecule și cisterne. Astăzi, denumirea dată de Porter a fost abandonată, păstrîndu-se numele de „ergastoplasmă" dat de Garnier.

Palade (1953 și 1955) descoperă, tot cu microscopul electronic, însă întrebuințînd măriri mai puternice și o rezoluție superioară, prezența unor granule de 100 — 150 Å adsorbite pe suprafața formațiunilor ergastoplasmice (fig. 101). Faptul că aceste formațiuni au o densitate electronică

Scanned with OKEN Scanner

accentuată a făcut să se presupună că ele conţin o mare cantitate de ARN. Într-adevăr, Peterman şi Hamilton (1955) constată că aceste formaţiuni — „granulele lui Palade" — sînt nucleoproteine, cu un conţinut de 50% ARN.

Problema microzomilor pare a fi elucidată în urma cercetărilor începute de Bernhard, Gautier şi Rouiller (1954). Aceşti autori arată că în timp ce în omogenatele celulare microscopul electronic poate pune în evidenţă microzomii, aceştia sînt absenţi în secţiunile aceloraşi celule. De aici, concluzia după care microzomii trebuie consideraţi ca fiind fragmente de ergastoplasmă. Un an mai tîrziu, Oberling şi Bernhard (1955) susţin într-un articol dedicat structurilor celulare că : „ergastoplasma ne apare ca o organizare temporară a citoplasmei în raport cu sinteza proteinelor". La concluzii similare ajung şi Palade şi Siekevitz (1956), care constată pe preparatele lor, examinate cu microscopul electronic, că microzomii sînt constituiţi din vezicule de dimensiuni variabile, avînd pe suprafaţa lor numeroase granule foarte fine, dense, care reprezintă „granulele lui Palade". Autorii constată de asemenea că microzomii sînt sensibili la acţiunea bilei şi a dezoxicolatului de sodiu. Concluzii similare rezultă şi din cercetările lui Littlefield, Keller, Gross şi Zamecnik (1955), care izolează „ultramicrozomii" prin tratarea cu dezoxicolat de sodiu a fracţiunii microzomale. Prin ultracentrifugare se depun, după acest tratament, granule foarte fine, nucleoproteice, cu un conţinut bogat de ARN şi cu dimensiunile cuprinse între 100 şi 200 Å. Aceste formaţiuni, granulele lui Palade, conţin o mare cantitate de ARN (Peterman şi Hamilton, 1955) ; ele poartă astăzi numele de ribozomi. S-a dovedit că întreaga cantitate de ARN prezentă în microzomi, care după Hesin (1954) este de 193 µg/1mg proteină, se găseşte în ribozomi.

Datorită faptului că funcţiunile chimice pe care le deţin microzomii trebuie în realitate atribuite ribozomilor, în cele de mai jos aceste funcţiuni se raportează ribozomilor.

Primii autori care au presupus că „granulele citoplasmice", bogate în ARN, joacă un rol important şi activ în sinteza proteinelor, au fost Brachet şi Jeener (1944), care au susţinut acest fapt încă din 1944. La această părere se asociază Palade (1955), care constată că granulele descrise de el sînt cu atît mai numeroase, într-o celulă, cu cît aceasta conţine o cantitate mai mare de ARN şi cu cît sinteza proteică este mai accentuată. Aceeaşi observaţie asupra relaţiei dintre cantitatea de ARN conţinută în ribozomi şi intensitatea sintezelor proteice este relatată şi de Allfrey şi colab. (1953), ca şi de Oota şi Osawa (1954). Mai mult decît atît, proba evidentă a rolului activ jucat de ribozomi în sinteza proteinelor a fost adusă atunci cînd s-a constatat că tratarea cu RN-ază a ribozomilor opreşte sinteza. Experienţa a dovedit că încorporarea acizilor aminaţi marcaţi în proteine este extrem de sensibilă la acţiunea nucleazei, în timp ce celelalte funcţii enzimatice ale ribozomilor sînt mult mai puţin afectate de acest tratament (Allfrey şi colab., 1953 ; Zamecnik şi Keller, 1954). Rolul ribozomilor, prin interme-

diul ARN, în sinteza proteinelor este astăzi pe deplin dovedit; cercetările experimentale realizate în această direcţie, ca şi concluziile care s-au impus, au fost discutate în detaliu într-un alt capitol.

Compoziţia bazelor ARN extras din ribozomii de *E. coli* după Semancik şi Bancroft (1964), raportată la acidul adenilic (1,00) este următoarea: ac. citidilic 0,88; ac. guanilic 1,30; ac. uridilic 0,77.

Pe lîngă funcţia pe care o au în sinteza proteică, microzomii mai au numeroase alte proprietăţi enzimatice, dintre care citǎm: esteraza (Omachi şi colab., 1948); triacetil-actonaza (Meister, 1952); colesteraza (Schotz şi colab., 1953); vitamina A-esteraza (Ganguli şi Denel, 1953); glucozo-*6*-fosfataza (Berthet şi Duve, 1951) etc.

Siekevitz (1955), pe baza faptului că în microzomi se găseşte o cantitate importantă de inozină, deduce existenţa unor procese metabolice intense ale nucleotidelor şi nucleozidelor în aceste formaţiuni.

Faptul că microzomii au fost asemănaţi de unii autori cu virusurile pare astăzi un paradox. Este ştiut că virusurile au o serie de proprietăţi care le deosebesc fundamental de formaţiunile fiziologice care se găsesc în mod obişnuit în interiorul celulei. Pe de altă parte, aşa cum a reieşit din cele de mai sus — microzomii, în înţelesul dat de Claude — nu există în interiorul celulei intacte, ei apar în omogenatele celulare, datorită distrugerii ergastoplasmei, în urma tratamentului mecanic necesar omogenizării. Totuşi, Claude (1943) mai întîi, şi apoi Brachet (1949) au făcut o apropiere între microzomi şi virusuri datorită similitudinii dintre aceste două tipuri de formaţiuni, prin dimensiuni, conţinut în acid nucleic şi capacitatea de autoreplicare. Mai mult decît atît, Shaver şi Brachet (1949) „inoculează" microzomi pe membrana corioalantoidă a oului embrionat de găină în vederea obţinerii unei culturi şi a unor eventuale leziuni caracteristice. Deşi autorii observă o creştere a bazofiliei celulelor membranei, atribuind-o unei multiplicări a microzomilor, totuşi privesc acest rezultat cu destul spirit critic pentru a-l atribui unei acţiuni nespecifice. Cercetări similare întreprinse de Le Clerc (1954) conduc la concluzia că celulele corioalantoide „inoculate" cu microzomi suferă modificări enzimatice, traduse prin modificarea concentraţiei glucozo-*6*-fosfatazei. Cu toate rezultatele obţinute, aceste cercetări nu pot fi considerate altceva decît simple curiozităţi, pe de o parte pentru ideea unei apropieri între virusuri şi microzomi, iar pe de altă parte pentru obţinerea unor modificări nespecifice datorite ţesutului eterolog. Ele trebuie să fie prezente totuşi în mintea experimentatorului, ferindu-l de interpretări eronate.

Cercetări morfologice, realizate în ultimii ani cu ajutorul microscopului electronic, au permis să se ajungă la unele concluzii interesante, atunci cînd se întrebuinţează aparate cu putere de mărire şi rezoluţie corespunzătoare. Astfel, Siekevitz şi Palade (1960) descriu prezenţa unei substructuri în ribozomii din celulele pancreatice. Smetana (1964) semnalează aspecte similare la ribozomii celulelor medulare umane. În unele condiţii, ribozomii se pot prezenta sub formă de agregate (poliribozomi) în interio-

Scanned with OKEN Scanner

rul citoplasmei celulei hepatice (Björkman, 1964), în neuroni (Ekholm şi Hydén, 1964) etc. (fig. 102 şi 103). Aceste aglomerări sînt sediul sintezei proteice (Gierer, 1963).

Un studiu amănunţit a fost realizat de Kisselev şi Spirin (1964) asupra morfologiei şi proprietăţilor ribozomilor de *E. coli*. Autorii pornesc de la o suspensie de ribozomi de 70 *S* pe care îi disociază în ribozomi de 50 *S* şi 30 *S* prin tratare cu o soluţie de 0,5 M NH_4Cl. În absenţa ionilor de Mg^{++}, aceste formaţiuni se rezolvă în fibre de ribonucleoproteină, care la microscopul electronic se prezintă sub forma unor filamente cu diametrul de 30 — 40 Å. Adăugarea sării de magneziu redă aspectul morfologic al particulelor compacte originale. Prin colorare negativă, ribozomii prezintă două aspecte : rotunzi sau pentagonali de 130 — 160 Å şi rectangulari de 120 × 140Å. Ribozomii de 50 *S* se prezintă în microscopul electronic de formă cilindrică, avînd pe suprafaţă subunităţi proteice cu un diametru de aproximativ 30 Å. În cazul tratării bacteriei cu cloramfenicol, se izolează ribozomii cu un conţinut normal de ARN, dar cu o cantitate mult mai scăzută de proteine. Autorii consideră aceste formaţiuni de 25 *S* şi 19 *S* ca fiind precursori ai ribozomilor.

În afară de ribozomi care conţin aproximativ 80 % din acidul ribonucleic celular, şi de mitocondrii, în care unii autori au găsit aproximativ 4 % (rezultat care este însă controversat), o cantitate de ARN echivalentă cu 10 — 15 % din cantitatea totală celulară se găseşte în hialoplasmă.

După sedimentarea în ultracentrifugă, la forţe gravitaţionale care depun formaţiunile celulare, în supernatant se poate pune în evidenţă un ARN care, datorită acestei proprietăţi a fost numit „solubil" (ARN-*S*), spre deosebire de cel microzomal. Acest ARN-*S* are o greutate moleculară mai mică (Zamecnik şi colab., 1958), faţă de ARN microzomal, care în unele cazuri atinge 2 000 000. ARN-*S* poate fi precipitat din soluţie prin ajustarea pH-ului la 5. Rolul acestui acid nucleic este a transfera aminoacizii activaţi la ARN microzomal.

Nucleolul. Un component prezent întotdeauna în nucleul celulelor, cu rol important în fiziologia celulară, este nucleolul. Întotdeauna vizibil în interfază, nucleolul dispare în perioada schimbărilor nucleare profunde, care caracterizează diviziunea, pentru a reapare în telofază. Un punct de vedere interesant asupra acestei evoluţii morfologice şi funcţionale a nucleolului este cel formulat de Oberling şi Bernhard (1955) : „Se poate imagina că în nucleu există două sisteme genetice, unul purtător al eredităţii generale, avînd ca sediu genomul clasic cromozomial, identic pentru toate celulele ; celălalt genomul somatic, purtător al eredităţii citoplasmice, localizat în nucleol, diferit pentru fiecare varietate celulară. În timpul mitozei, genomul cromozomial este în plină activitate şi, funcţiunile somatice fiind suspendate, nucleolul este invizibil. Din contră, în timpul interfazei, genomul somatic este în plină dezvoltare, în timp ce cromozomii au dispărut".

Scanned with OKEN Scanner

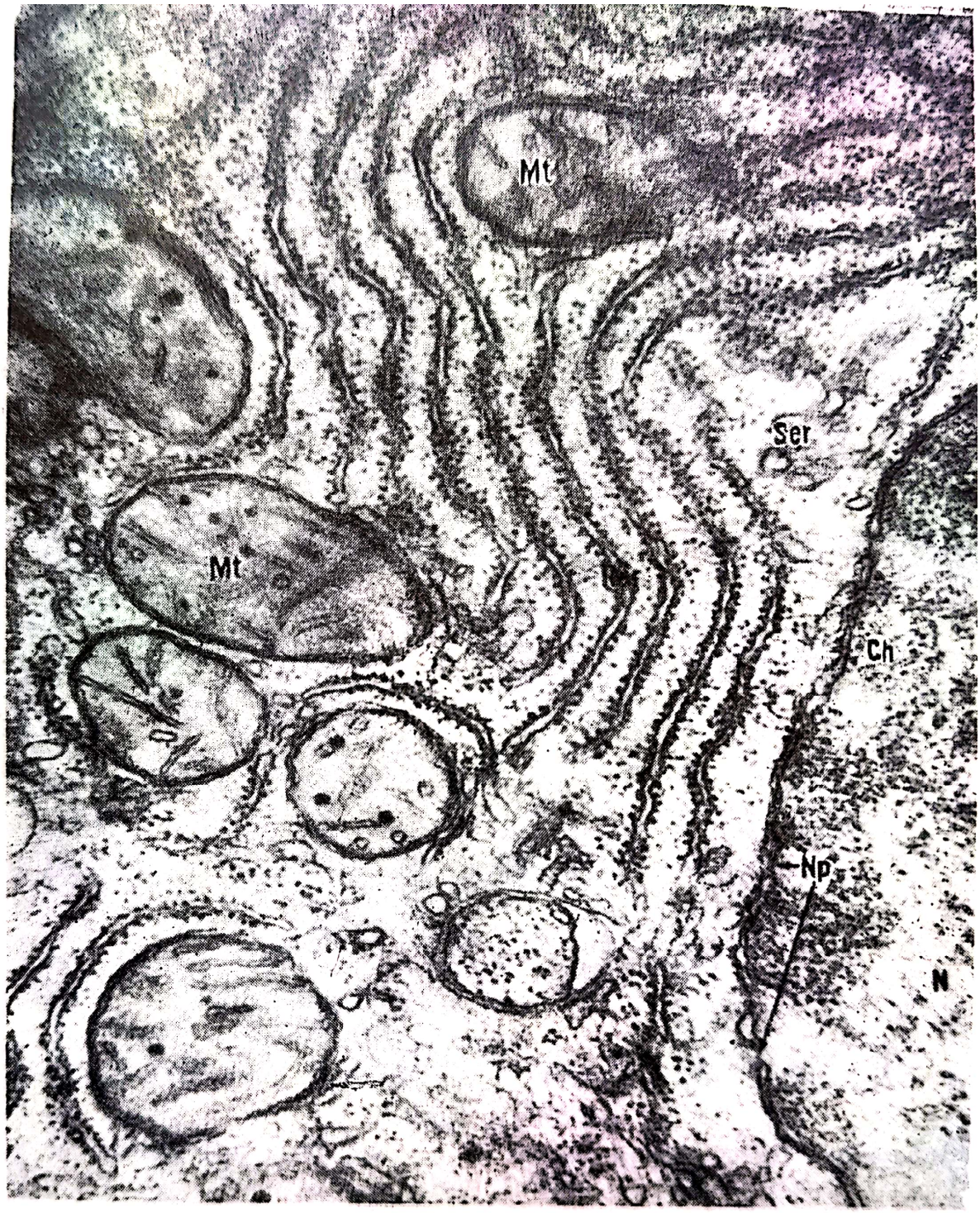


Fig. 101. — Porţiune din nucleul şi citoplasma unei celule parenchimatoase din ficatul de şobolan în post. Se observă canaliculele ergastoplasmice cu ribozomii ataşaţi pe suprafaţă. Ribozomi liberi în citoplasmă.

N = nucleu; *Np* = pori în membrana nucleară; *Ch* = cromatină; *Mt* = mitocondrii. Mărire 41 500 × (după Reynolds, 1963).

Scanned with OKEN Scanner

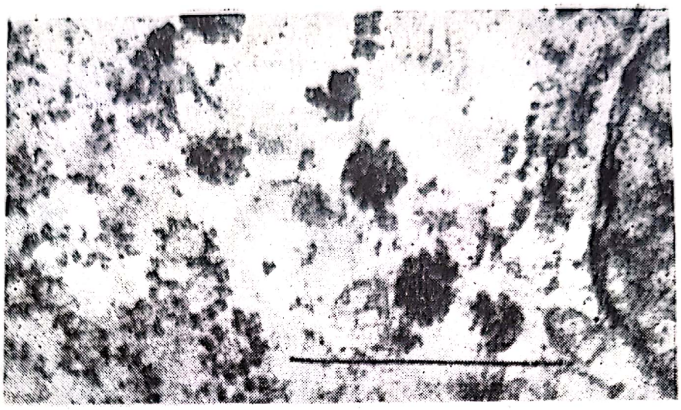


Fig. 102. — Ribozomi : lanţuri (stg.), agregate (mijloc), lipiţi de membrana nucleară (dr.) (după Björkman, 1964).

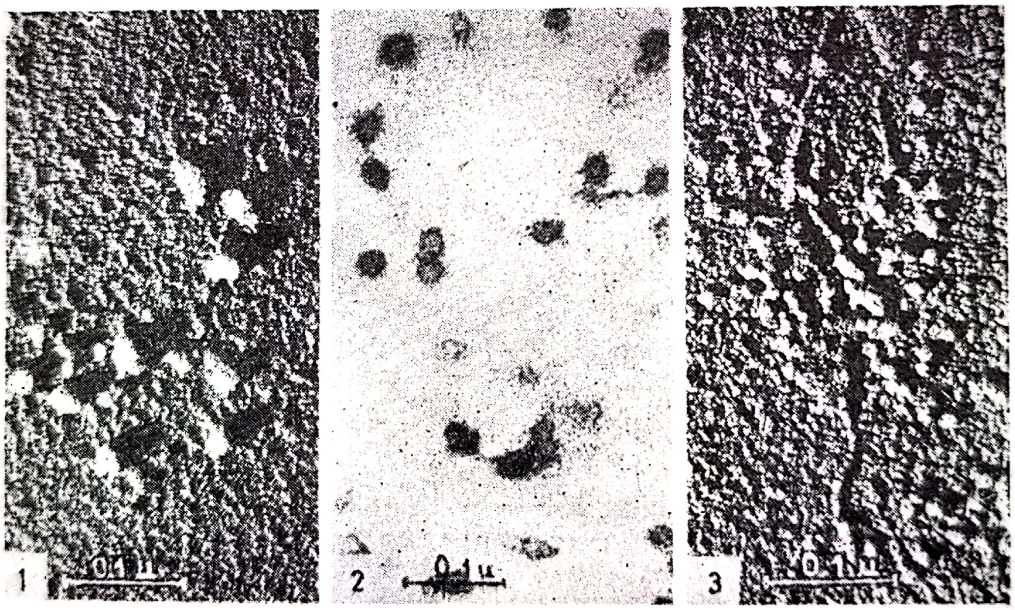


Fig. 103. — Ribozomi de 230 Å (*1*), coloraţi cu acetat de uranil (*2*). Ribozomi de 100 Å, dispuşi parţial în polizomi (*3*) (după Ekholm şi Hydén, 1964).

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 104. — Nucleu de celulă pancreatică. Se observă structura criblată a nucleolului (*nu*) ; *ch* = cromatină ; *m* = mitocondrie ; săgeţile indică porii din membrana nucleară. Mărire 12 300 × (după Sabatini şi colab., 1963).

Scanned with OKEN Scanner

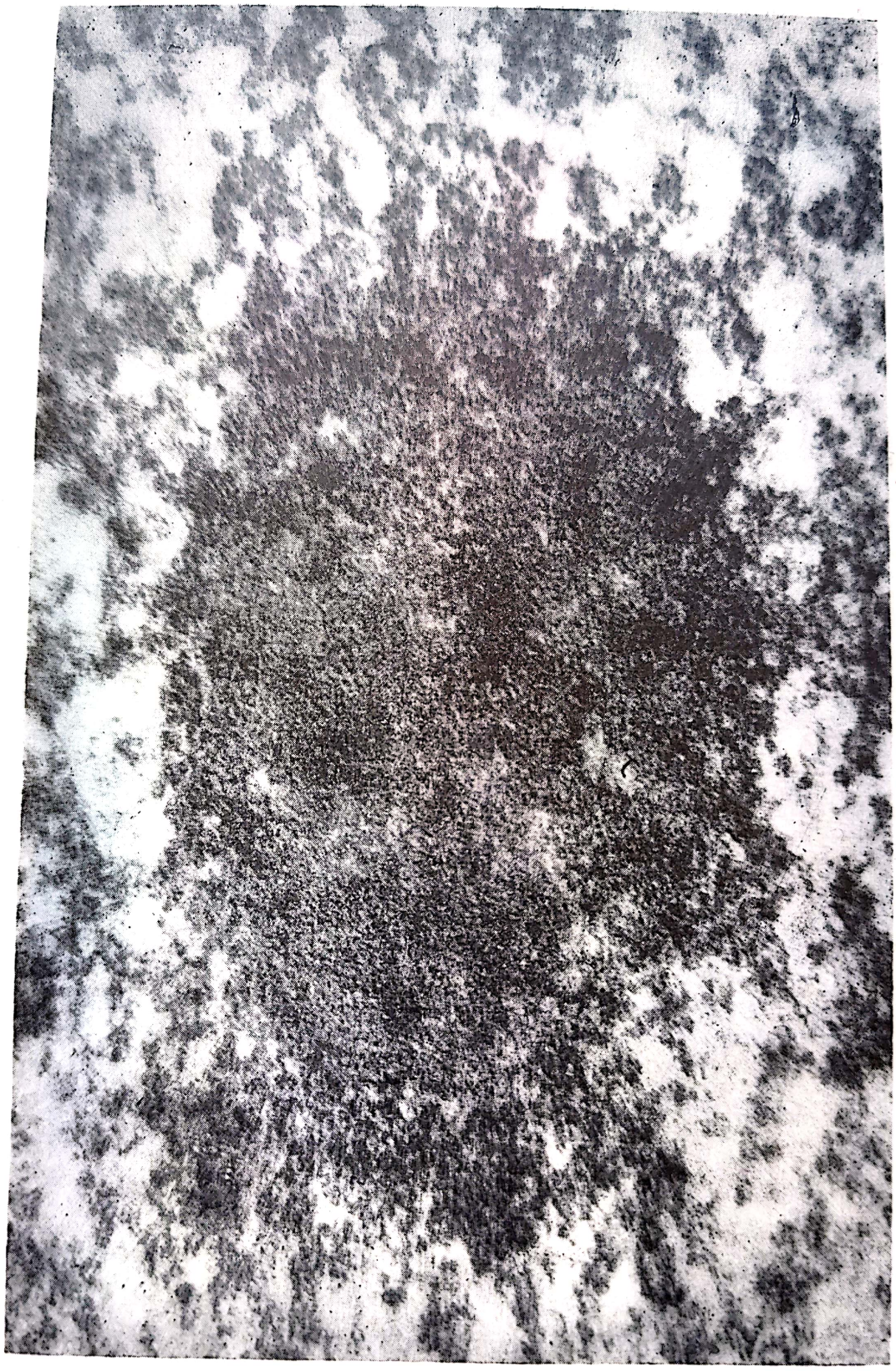


Fig. 105. — Nucleol de celulă pulmonară de șoarece normal. Se observă lipsa unei membrane limitante între nucleol și conținutul nucleului. Aspectul ciuruit al nucleolului este evident. De remarcat structura granulară, reprezentată de granulele polimorfe de ribonucleoproteină, dense în fasciculul de electroni. Mărire 70 000 × (fotografie originală obținută prin amabilitatea dr. Al. Petrescu).

Scanned with OKEN Scanner

Examinat cu microscopul optic, pe un preparat histologic colorat, nucleoul apare sferoidal, uneori omogen, alteori fin ciuruit. Microscopul electronic însă permite disecarea morfologică a acestei formaţiuni, care apare de cele mai multe ori fin granulat, presărat cu ochiuri optic goale, de dimensiuni variate (fig. 104). Uneori, aspectul său este de cordon înghemuit în variate forme. Ceea ce trebuie remarcat este lipsa unei membrane limitante care să separe nucleolul de restul conţinutului nuclear (fig. 105). Acest caracter subliniază şi mai mult legătura funcţională dintre conţinutul nucleolar şi cel nuclear. Este meritul lui Bernhard şi colab. (1952) şi Oberling şi Bernhard (1955) de a fi semnalat asemănarea izbitoare dintre granulele observate în nucleol şi cele decelate în citoplasmă, granulele lui Palade, ribozomii. În adevăr, ambele tipuri de granule sînt constituite din ribonucleoproteine, şi ambele au roluri esenţiale în metabolismele celulare. Granulele nucleolare sînt de cele mai multe ori distribuite în lungul unor filamente fine, care, după terminologia propusă de Estable şi Sotelo (1951 şi 1954), reprezintă nucleolonema. Aceşti autori descoperă în interiorul nucleolului două componente: nucleolonema şi *pars amorfa*. Lettré (1954) reuşeşte să pună în evidenţă prezenţa ADN în nucleolonemă, în timp ce în *pars amorfa* găseşte ARN.

Primele cercetări clasice în domeniul citochimiei acizilor nucleici în general şi a ARN în special sînt cele realizate în 1939 de Caspersson şi Schultz (1939), urmate de cele ale lui Brachet (1940). Deşi tehnicile utilizate de aceşti cercetători sînt diferite (Caspersson întrebuinţează microscopia în lumină ultravioletă, iar Brachet reacţiile chimice), concluziile lor sînt superpozabile. Aceste concluzii au fost sintetizate de Caspersson (1941, 1947 şi 1950) în regula după care „centrul principal al sintezei proteice celulare îl reprezintă nucleolul prin conţinutul său în ARN". În 1947, Caspersson ajunge la formularea unor legi care ulterior au fost pe deplin verificate şi unanim recunoscute. Ele pot fi rezumate astfel: *1*) orice sinteză proteică reclamă prezenţa acizilor nucleici; *2*) cantitativ cel mai important acid nucleic din cromozomi este de tip dezoxiribonucleic; *3*) nucleul este componenta celulară special organizată ca centru de dirijare a sintezei proteinelor.

Mecanismul sintezei proteice prin intermediul ARN este bine precizat astăzi. El a fost pe larg discutat în alt capitol, ceea ce ne face să nu mai revenim asupra acestui subiect. Ceea ce însă vrem să subliniem este că cercetările care au condus la precizarea mecanismului acestei sinteze au avut ca punct de plecare rezultatele obţinute şi legile formulate de Caspersson. Se ştie astăzi că ADN condiţionează sinteza ARN, care la rîndul lui dirijează sinteza proteinei. Aceste concluzii postulate de Rich şi Watson (1954), Gale şi Folkes (1954), l-au condus pe Crick (1958) să formuleze legea codului informaţiei genetice.

În timpul evoluţiei celulare, atît nucleolul, cît şi mitocondriile sînt animaţi de mişcări care îi aduc temporar în contact, prin intermediul membranei celulare, după cum rezultă din imaginile microcinematografice realizate

Scanned with OKEN Scanner

de Frédéric (1955). În acest moment, o parte din substanţele nucleolare sînt transferate în citoplasmă (Duryee, 1950; Altmann, 1952; Lettré şi Siebs, 1954).

Cu toate aceste observaţii asupra rolului ADN în sinteza proteinelor prin intermediul ARN nuclear, cercetări realizate cu *Acetabularia*, anucleate, dovedesc posibilitatea sintezei proteinelor citoplasmice şi a enzimelor specifice produse exclusiv de acidul ribonucleic citoplasmatic (Brachet, 1961). Mai mult decît atît, Naora şi colab. (1960) pun în evidenţă prezenţa indiscutabilă a unei sinteze de ARN în cloroplastele de *Acetabularia* lipsită de nucleu.

Utilizarea izotopilor radioactivi, în special P^{32}, a putut arăta pe imaginile histoautoradiografice că nucleul este sediul unui intens metabolism al ARN (Stich şi Hämmerling, 1953; Hämmerling şi Stich, 1956; Vanderhaeghe, 1957).

După toate probabilităţile, nucleolul îşi are originea în cromatina organizată în cromozomi. Nu trebuie uitat faptul că nucleolul dispare din nucleu încă de la începutul procesului mitotic, pentru a reapare în telofază. Faptul că nucleolul este lipsit de membrană face ca substanţa sa constitutivă să fie în permanent contact direct cu substanţa nucleară, suferind astfel influenţa nemijlocită a transformărilor ce se petrec în acesta din urmă. Mai mult decît atît, este chiar posibil ca unele substanţe de origine cromatiniană să pătrundă în perioada interfazei în nucleol, după cum susţin Goldstein şi Micou (1959). Nu trebuie de asemenea uitat că nucleolul este compus dintr-o ribonucleoproteină. Este cunoscut că ARN este sintetizat de ADN, ceea ce implică generarea nucleolului într-un anumit loc al unui anumit cromozom. Este de asemenea demn de subliniat că numărul de nucleoli existenţi într-o celulă este în directă legătură cu zestrea cromozomială ; în mod obişnuit, celulele somatice conţin un nucleol pentru fiecare set cromozomial (Mirsky şi Osawa, 1961).

Cercetările realizate de Heitz (1931) au demonstrat că nucleolul ia naştere pe o anumită regiune a unui anumit cromozom; autorul atrage atenţia cu această ocazie asupra faptului că nucleolul nu se formează din substanţa însăşi a cromozomului. Cercetările ulterioare ale lui Mc Clintock (1934) confirmă şi completează aceste observaţii.

În ultimii ani, microscopia electronică, graţie obţinerii secţiunilor ultrasubţiri, a permis studierea amănunţită a mecanismului formării nucleolului.

Într-un studiu sistematic al evoluţiei nucleolului în cursul procesului de diviziune mitotică a nucleului, Lafontaine (1958) reuşeşte să pună în evidenţă, pe secţiuni seriate, existenţa unui material fin granular, propriu nucleolului, care se amestecă cu substanţa cromatinică, în timpul evoluţiei mitozei. Aceste granule, diferite de cele cromatiniene, pot fi urmărite în cursul anafazei. În prima perioadă a telofazei ele încep să se aglomereze pentru a forma în ultima fază a telofazei ceea ce autorul numeşte „corpi

prenucleolari". Aceştia fuzionează în anumite zone ale cromozomului pentru a da naştere nucleolului.

Influenţa cromatinei şi asociaţia acesteia cu substanţa nucleolară este pusă în evidenţă şi de Mulnard (1956), pe preparate colorate după metoda lui Feulgen. Rolul activ al ADN nuclear asupra metabolismului ARN nucleolar este subliniat şi de Sirlin (1960), care cu ajutorul autohistografiei observă că maximul de încorporare se observă în ARN situat în apropierea cromozomilor. Întrebuinţînd aceeaşi tehnică, Vincent (1955 *a*) observă că ARN nucleolar încorporează P^{32} de 100 pînă la 1 000 de ori mai intens decît ARN citoplasmatic. Această constatare face pe autor să afirme că ARN nucleolar este extrem de activ. Acesta, foarte solubil, specific, sintetizat în nucleol, este transferat ulterior în citoplasmă (Vincent, 1955 *b*). Transferul ARN de origine nucleolară în citoplasmă, susţinut de Vincent în 1955, este în contradicţie cu observaţiile aceluiaşi autor, care în 1952 constată că compoziţia ARN nucleolar este diferită de aceea a ARN citoplasmatic prin proporţia diferită a bazelor purinice şi pirimidinice (Vincent, 1952).

Transferul ARN nucleolar spre citoplasmă a fost studiat şi de Goldstein şi Plaut (1955) cu ajutorul autoradiografiilor. Prin impregnarea unei amibe cu P^{32}, acesta pătrunde în nucleu; transferul acestei formaţiuni în altă celulă dovedeşte că ARN marcat migrează din nucleu în citoplasmă începînd din a 12-a oră.

Cercetări recente comparative, realizate de Lafontaine şi Chouinard (1963) cu ajutorul microscopului optic şi electronic, au adus noi precizări asupra formării nucleolului. Examinat cu microscopul optic, nucleolul în profază este constituit dintr-un material dens, colorat, în care se observă structuri similare vacuolelor, de dimensii variate, necolorate. Microscopul electronic arată că materialul dens este format din două componente distincte (fig. 106): unul constituit din granule de 150 Å, libere sau aşezate în lanţuri de aproximativ 0,1 μ diametru, celălalt din fibrile de 60—100 Å diametru. Vacuolele conţin granule răspîndite neregulat şi fibrile. Componentele granulare şi fibrilare din porţiunile dense ale nucleolului persistă în tot timpul profazei şi se dispersează în întreaga cavitate nucleară în timpul dezintegrării nucleolului. În timpul dispariţiei membranei nucleare, aceste elemente se amestecă cu cele ale nucleoplasmei şi cu elemente similare prezente în fusul nuclear. Autorii constată că o parte din substanţa matrice existentă în timpul profazei tardive, metafazei şi anafazei este formată probabil într-un anumit moment al profazei şi eliberată din cromozomi în timpul mişcărilor. Cea mai mare parte a nucleolului este derivată dintr-un material fibrilo-granular, prenucleolar. Acest material constituit din fibrile de 0,1 μ diametru se adună în spaţiile intercromozomiale în timpul telofazei timpurii şi medii. Datele obţinute de Lafontaine, susţin punctul de vedere după care cea mai mare parte a acestui material prenucleolar rezultă dintr-o reluare a activităţii de sinteză a cromozomilor din telofaza timpurie şi medie, decît dintr-o substanţă matrice preexistentă.

Scanned with OKEN Scanner

Jacob şi Sirlin (1964) descriu, cu ajutorul microscopului electronic, trei zone structurale de organizare a nucleolului. Aceste zone sînt aşezate proximo-distal faţă de regiunea de contact a nucleolului cu organizatorul. Zona proximală este compusă din granule fine de 150 Å şi fibrile, urmată de o zonă amorfă (fig. 107); în sfîrşit, zona distală este formată din granule de 200—250 Å. Este de remarcat că formaţiunile prezente în zona proximală au un corespondent morfologic în cromozom, cu toate că fibrilele nucleolare sînt mult mai opace decît cele cromozomiale. Autorii remarcă de asemenea că materialul nucleolar este cu mult mai dens decît ceilalţi componenţi nucleari. În figura dată de autori în lucrarea lor o porţiune îngustă a nucleolului se află pe *locus*-ul organizator al cromozomului, a cărui structură în această zonă nu diferă de aceea întîlnită în alte zone (fig. 108).

Cu toate că rolul nucleolului nu este încă complet elucidat, totuşi din cele expuse mai înainte rezultă, cu toată evidenţa, participarea lui activă în sintezele ARN. Cu ajutorul izotopilor radioactivi şi al autohistoradiografiilor, s-a putut preciza că nucleolul este sediul activ al metabolismului nucleotidelor şi al moleculelor de ARN. Este de asemenea stabilit că circulaţia celulară a ARN sau a componentelor sale, înainte de sinteza macromoleculelor, este activ realizată între nucleol şi citoplasmă, atît într-un sens, cît şi în celălalt. Sinteza proteică intracelulară este sub directa dependenţă şi controlul ARN, sintetizat la rîndul lui sub controlul nucleolar. Este probabil că sintezele enzimelor necesare menţinerii funcţiunilor vitale celulare să fie şi ele supuse aceluiaşi control.

Întreaga cantitate de ARN din interiorul nucleului nu pare a fi localizată exclusiv în nucleol. Astfel, Mirsky (1947) reuşeşte să pună în evidenţă prezenţa ARN în cromozomii izolaţi, după îndepărtarea ADN şi a histonelor. Pe de altă parte, Brown şi colab. (1950) găsesc ARN în sucul nuclear al oocitelor unor amfibieni. Acest din urmă rezultat pare a verifica cele arătate mai sus asupra transferului acidului ribonucleic de la nucleol spre citoplasma celulară, în cursul proceselor metabolice celulare. Prezenţa acidului ribonucleic legat de cromozomi este de asemeni explicabilă, dacă ne reamintim mecanismul de sinteză al acidului ribonucleic, care se realizează pe modelul moleculei de ADN.

IZOLAREA COMPONENŢILOR CELULARI

Analizele fizico-chimice sau cele de fiziologie ce se realizează asupra celulei implică izolarea substructurilor celulare, pentru o mai bună localizare materială a funcţiilor vitale. Pentru a izola subunităţile celulare şi pentru a le păstra cît mai nealterată compoziţia chimică sau proprietăţile fiziologice, se impun o serie de precauţii indispensabile. În egală măsură sînt necesare să fie considerate cu toată atenţia metoda de spargere a celulelor, menţinerea pH-ului şi a molarităţii în limitele fiziologice, tra-

Scanned with OKEN Scanner

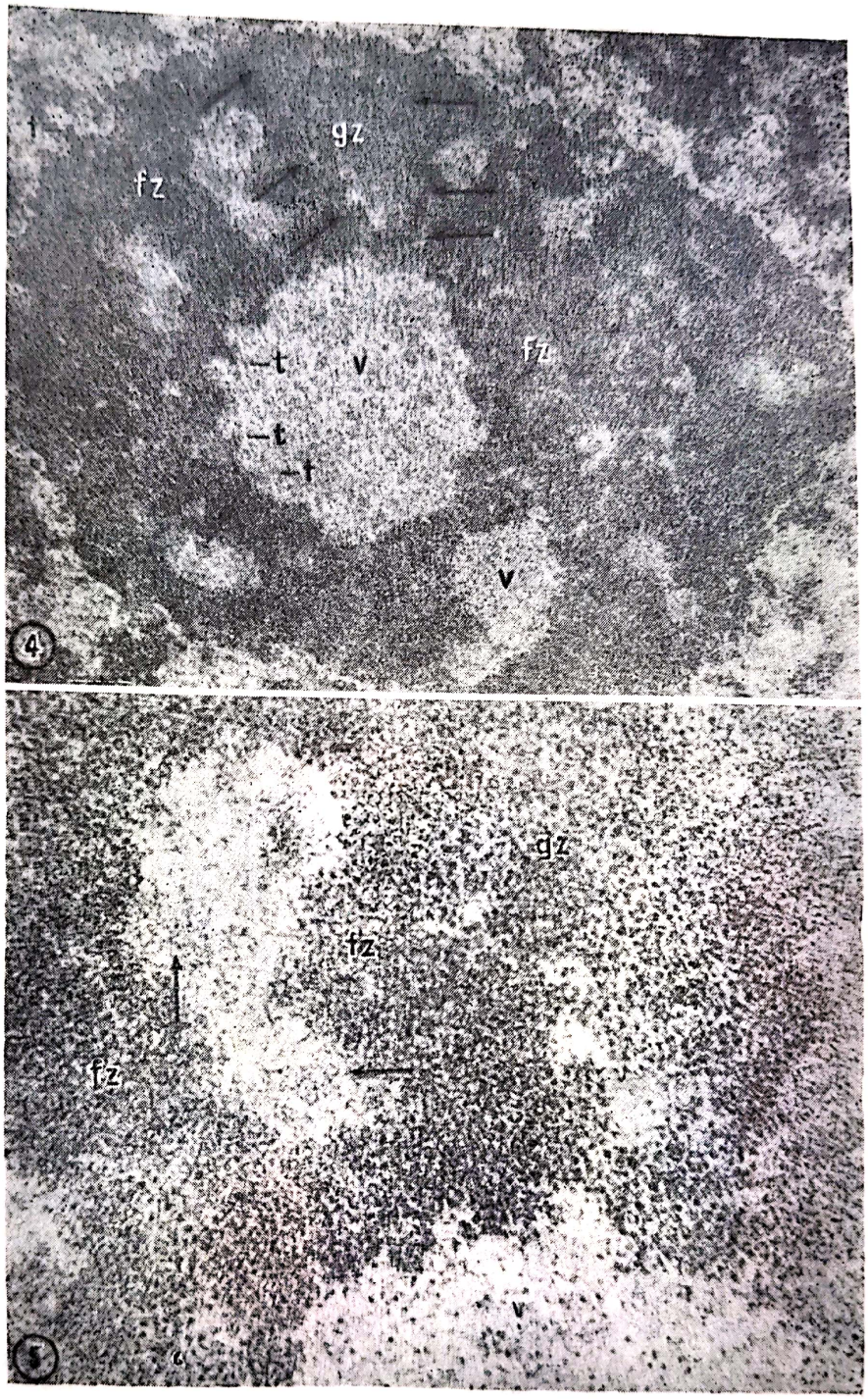


Fig. 106. — Nucleol în preprofază (sus). *gz* = zonă granulară; *v* = vacuole; *t* = prelungiri; *fz* = zonă fibrilară. Mărire 16 000 ×. Figura de jos este o porțiune mult mărită în care se observă: zona granulară (*gz*) constituită din particule de 150 Å, zona fibrilară (*fz*) ocupată de fibrile cu diametre de 60—100 Å vizibile mai ales în locurile indicate de săgeți (după Lafontaine și Chouinard, 1963).

Scanned with OKEN Scanner

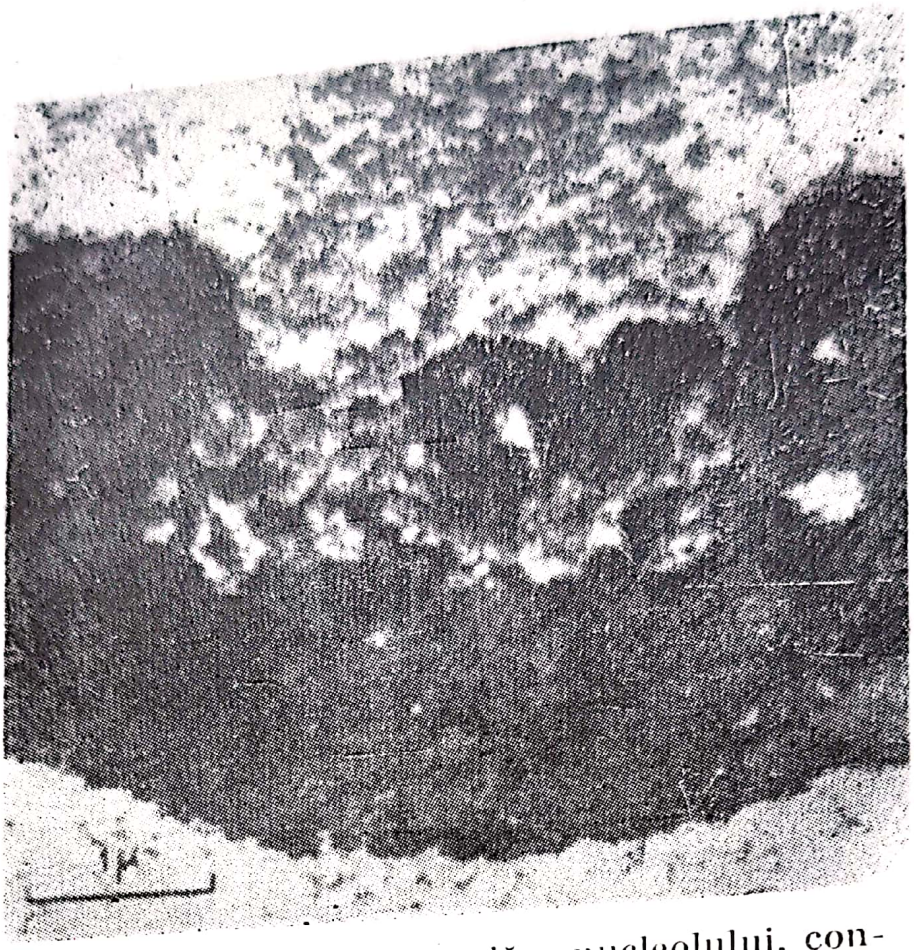


Fig. 107. — Zona proximală a nucleolului, contiguă cromozomului (după Jacob și Sirlin, 1964).

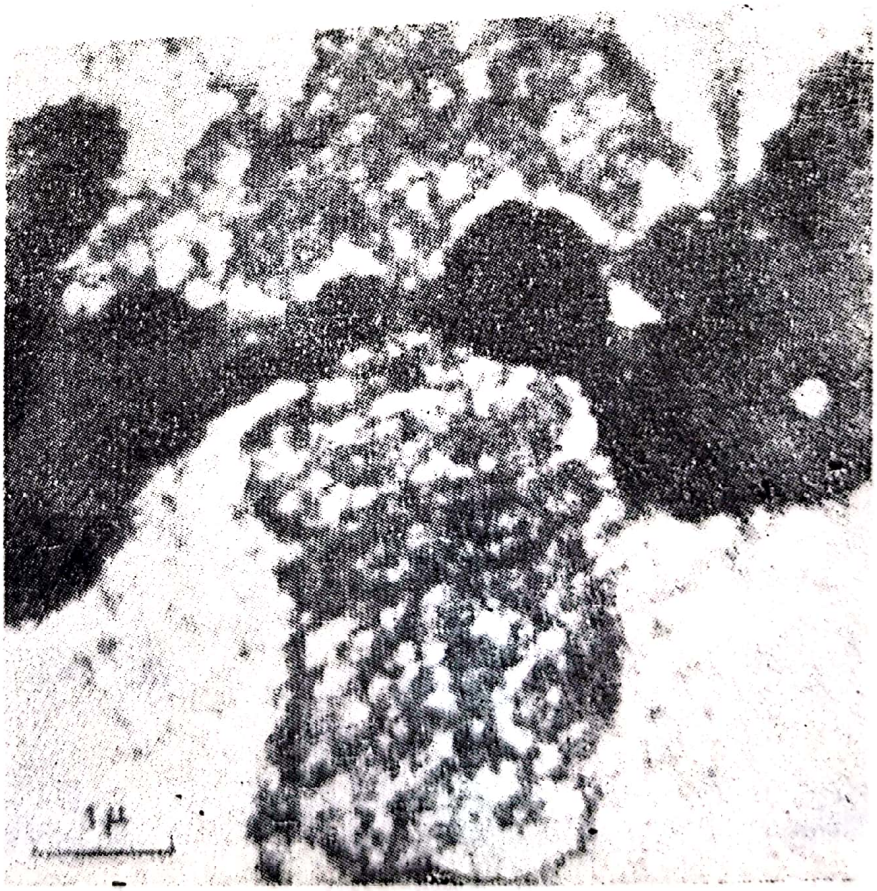


Fig. 108. — Material nucleolar la *locus-ul* organizator al cromozomului (după Jacob și Sirlin, 1964).

Scanned with OKEN Scanner

tarea produselor la temperatură joasă, fracţionarea prin centrifugări diferenţiale etc. Cercetările de izolare a subunităţilor celulare şi analizarea acestora au dovedit marea lor fragilitate, atît morfologică, cît şi chimică, atunci cînd sînt extrase din complexul celular viu. Se ştie astăzi că elementele chimice, componente ale celulei vii, sînt supuse degradărilor enzimatice într-un interval de timp extrem de scurt ca urmare a morţii celulare. Printre aceşti compuşi chimici, acizii nucleici şi în special ARN sînt poate cei mai sensibili, datorită în primul rînd fragilităţii lor moleculare. Nucleazele specifice, permanent prezente în celula vie, îşi manifestă activitatea degradînd acizii nucleici, astfel încît o analiză chimică realizată în absenţa unor condiţii tehnice riguroase va da rezultate total eronate.

Recoltarea ţesutului care urmează să fie supus fracţionării, trebuie făcută în primele minute care urmează sacrificării animalului. În adevăr, cercetările realizate cu ajutorul microscopului electronic (Sjöstrand şi Hanzon, 1954; Rhodin, 1961) au dovedit că intervalul de timp dintre moartea animalului şi debutul fixării nu poate depăşi 30 — 60 sec. Dacă această perioadă se prelungeşte la 5 min, apar în celule distrucţii masive, artefacte datorită acţiunii enzimelor celulare. Este uşor de înţeles că aceste alterări morfologice au şi un corespondent chimic, fapt care explică modificarea componenţilor chimici celulari şi impun cu strictețe o serie de precauţii. Dintre acestea, în afară de recoltarea rapidă a ţesutului, este necesară menţinerea sa la temperatură scăzută pentru a frîna acţiunea enzimatică.

Cercetarea modificărilor chimice survenite în funcţie de timp au arătat de exemplu că, după 5 min de la moartea animalului, cantitatea de ATP extrasă din timus scade la jumătate (Osawa şi colab., 1957), ca şi aceea a dezoxinucleotidelor (Le Page, 1957), în timp ce glicogenul hepatic ajunge, după 15 min, la 60% din valoarea iniţială (Torgerson şi colab., 1952).

Unii autori recomandă perfuzarea organului recoltat, înainte de a fi supus triturării, pentru a înlătura cantitatea de sînge pe care acesta îl cuprinde. Această precauţiune este necesară în special atunci cînd se procedează la identificarea şi dozarea componenţilor chimici, deoarece datele obţinute pot fi influenţate de prezenţa elementelor sanguine, care în anumite cazuri reprezintă un volum apreciabil. Astfel, în ficatul de şoarece masa sanguină reprezintă 30% (Storey şi colab., 1951), în timp ce în ficatul de şobolan 20% (Harrison, 1953). Pentru motivele arătate mai sus, lichidul de perfuzie trebuie răcit în timpul întrebuinţării; temperatura sa trebuie să fie cuprinsă între 0° şi maximum 5°.

Compoziţia lichidului de perfuzie este variată. Hogeboom şi Schneider (1950) preconizează perfuzarea organului mai întîi cu o soluţie clorurată izotonică, la rece, pînă cînd lichidul nu mai este colorat, urmată de o soluţie ce conţine 0,25 M zaharoză şi 0,0018 M clorură de calciu. În cercetările lui Philpot şi Stanier (1956) se utilizează ca lichid de perfuzie o

soluţie de clorură de sodiu 0,15 M, care după părerea autorilor este superioară soluţiilor în compoziţia cărora intră zaharoza.

Perfuzia se realizează cu ajutorul unei seringi al cărei ac, de mărime adecvată, se introduce într-o venă sau arteră principală. Lichidul se introduce încet pentru a evita crearea unei presiuni intraorganice exagerate, care ar putea determina distrucţii celulare cu devărsarea consecutivă a componentelor chimice. Cu toate precauţiunile care pot fi luate pentru a realiza o perfuzie în condiţii cît mai „fiziologice", Anderson (1956) atrage atenţia asupra modificărilor morfologice ce survin în interiorul mitocondriilor, ca urmare a acestui tratament.

Procedeele utilizate pentru omogenizarea ţesuturilor şi spargerea celulelor sînt de două tipuri : mecanice (ultrasunete, omogenizatoare de sticlă sau metalice de tip Waring Blendor, mori coloidale etc.) sau chimice (enzime specifice). Este de remarcat că procedeele mecanice sînt întrebuinţate de marea majoritate a cercetătorilor şi faptul nu este greu de înţeles, deoarece degradarea enzimatică poate conduce la rezultate care nu pot fi controlate în mod riguros. În omogenizatoarele mecanice evoluţia procesului de dezintegrare celulară trebuie urmărit la microscop pînă la stadiul dorit, cînd poate fi oprit.

Omogenizarea în Waring Blendor este poate procedeul cel mai brutal, deoarece după un scurt tratament anumite celule pot fi complet distruse, mitocondriile profund alterate, nucleii sparţi şi cromatina pusă în libertate. Acest procedeu este în special recomandabil pentru ţesuturile rezistente ; el poate fi de asemenea utilizat, ca şi moara coloidală, la obţinerea unei suspensii de cromozomi (Mirsky şi Ris, 1947, 1951). O importantă piedică în utilizarea unui Waring Blendor este riscul de încălzire peste limitele acceptabile a produsului supus omogenizării, datorită vitezei mari de rotire a cuţitelor.

Cele mai avantajoase şi recomandabile dispozitive de omogenizare sînt în momentul de faţă omogenizatoarele cu piston, confecţionate în întregime din sticlă. Ca prototip al acestora este considerat astăzi omogenizatorul Potter-Elvehjem, descris în 1936, dar imaginat de Hagan în 1922. Acest instrument este constituit dintr-un piston cilindric, sudat la capătul unei vergele din sticlă, şi care pătrunde într-o eprubetă calibrată. Etanşeitatea dispozitivului este asigurată prin şlefuirea pistonului în corpul eprubetei cu ajutorul prafului fin de carborund. Se obţine astfel un joc între piston şi cilindru care permite triturarea celulelor pe suprafaţa rugoasă creată de abraziv. Pentru a întrebuinţa instrumentul, se cuplează pistonul, prin intermediul vergelei de sticlă, la un mic motor electric, reglabil cu ajutorul unui reostat. Ţesutul care urmează a fi triturat se aşează în eprubetă, apoi se introduce pistonul şi se porneşte motorul. Dispozitivul fiind menţinut în tot timpul lucrului într-un vas umplut cu bucăţele de ghiaţă, se evită încălzirea excesivă a omogenatului. Prin mişcări alternative în sus şi în jos a eprubetei se asigură o triturare bună a ţesutului. Din timp în timp se examinează la microscop o picătură recoltată din omogenat pe

preparat între lamă şi lamelă sau după colorare. Se opreşte triturarea cînd scopul dorit a fost atins. Un mare şi poate singurul dezavantaj al omogenizatoarelor Potter îl constituie încălzirea preparatului datorită suprafeţei mari de frecare a pistonului, care se roteşte cu viteză în cilindru. Pentru a evita aceasta, Dounce şi colab. (1955) înlocuiesc pistonul cilindric cu o sferă, a cărei suprafaţă de frecare pe pereţii cilindrului este infinit mai redusă. În plus, mişcarea de triturare în acest dispozitiv nu este circulară, ci de sus în jos, forţînd astfel preparatul să treacă prin spaţiul îngust dintre sferă şi pereţi. Un sistem asemănător fusese propus de Stern şi colab. (1952), pistonul fiind înlocuit şi în acest caz cu o sferă sudată la capătul unei vergele de sticlă. Indiferent de tipul de omogenizator întrebuinţat, toată operaţia trebuie efectuată la temperatură joasă, pentru a evita degradarea compuşilor chimici prin încălzire.

După omogenizare, preparatul trebuie filtrat printr-o pînză cu ochiuri dese, pentru a opri fibrilele care se găsesc în ţesutul omogenizat.

Lichidele întrebuinţate pentru suspendarea celulelor în timpul omogenizării sau în operaţiile care urmează acesteia sînt variate.

Acidul citric în soluţie apoasă de concentraţii diferite este întrebuinţat pentru obţinerea nucleilor izolaţi. După Mirsky şi Pollister (1946) ţesutul se dilacerează, cu ajutorul unui omogenizator, într-o soluţie de acid citric 1%. După o primă centrifugare de 10 min la 2 000 *g*, sedimentul se resuspendă în 0,2% acid citric şi se continuă omogenizarea. Prin cicluri alternative de centrifugări şi omogenizări succesive se obţine o suspensie curată de nuclei.

Allfrey şi Mirsky (1957) întrebuinţează pentru izolarea nucleilor, zaharoza în soluţie 0,25 M, la care se adugă 0,0033 M clorură de calciu.

Prepararea mitocondriilor se realizează în omogenizatoare de tip Potter întrebuinţînd soluţii de zaharoză de 0,25 M. O primă centrifugare de 10 min la 700 *g* depune nucleii şi resturile celulare, iar mitocondriile sînt sedimentate în 10 min la 5 000 *g* (Hogeboom şi Schneider, 1950). Mitocondriile pot fi izolate şi în soluţie de zaharoză de 0,44 M sau în 0,88 M, dar în acest din urmă caz ele îşi pierd activitatea. Soluţia de 0,25 M le conservă atît forma, cît şi activitatea.

Din supernatantul obţinut după sedimentarea mitocondriilor se pot izola microzomi printr-o primă centrifugare de 60 min la 54 000 *g*, urmată de o resuspendare în zaharoză 0,25 M şi o sedimentare la 148 000 *g* în 30 min.

După Keller şi Zamecnik (1956) microzomii celulei hepatice sînt preparaţi în următorul mod: ţesutul hepatic este omogenizat într-un aparat de sticlă într-o soluţie hipertonică tamponată (zaharoză 0,35 M; $KHCO_3$ 0,035 M; $MgCl_2$ 0,004 M; KCl 0,025 M). Prin centrifugare la 15 000 *g* timp de 10 min se izolează supernatantul care conţine microzomii şi se diluează în proporţie de 1 : 3 cu o soluţie care conţine zaharoză 0,90 M, $MgCl_2$ 0,004 M şi KCl 0,025 M. Această suspensie se centrifughează timp

de o oră la 105 000 *g*, în care timp microzomii sînt depuşi în fundul tubului. Sedimentul se resuspendă în prima soluţie cu ajutorul unui omogenizator.

Recent, Bergstrand şi colab. (1964) descriu o tehnică de izolare a microzomilor prin centrifugare în gradient. Ţesutul hepatic se omogenizează într-o soluţie de zaharoză 0,25 M. Fracţiunile nucleare şi mitocondriale sînt sedimentate la 10 000 *g* în 20 min. În supernatant se adaugă o soluţie de CsCl 1 M pînă la o concentraţie finală de 15 mM Cs^+. O cantitate din această suspensie (7 ml) se aşează într-un tub de centrifugă peste un volum (4,5 ml) din soluţia de zaharoză 1,3 M la care s-a adăugat CsCl 1 M pentru o concentraţie finală de 15 mM. Acest sistem de gradient se centrifughează la 250 000 *g* timp de 60 min (fig. 109). În fundul tubului se depune fracţia I. În jurul zonei de gradient apare un strat gros de 3—4 mm. Se pipetează acest strat împreună cu coloana de zaharoză. La această suspensie se adaugă o soluţie de $MgCl_2$ 1 M pînă la o concentraţie finală de 10 mM Mg^{++}; 7 ml din această diluţie se adugă peste 4,5 ml soluţie de zaharoză 0,15, care conţine 10 mM Mg^{++} şi se centrifughează la 250 000 *g* timp de 30 min. Se depune un sediment care constituie fracţia II, în timp ce la limita de gradient apare o zonă întunecată. Aceasta se aspiră împreună cu soluţia de zaharoză şi se centrifughează din nou, de data aceasta fără gradient de densitate, la 250 000 *g* timp de 60 min. Se obţine astfel sedimentul final constituit din fracţia III. Se constată că întreaga activitate enzimatică microzomială este cuprinsă în fracţiile I şi II (fig. 110 şi 111). Analiza acestor fracţii a arătat că raportul ARN/proteină este de 0,30 în fracţia I şi de 0,05 în fracţia II.

Izolarea în stare pură a subfracţiunilor celulare a permis pe de o parte identificarea chimică a componentelor elementelor morfologice, iar pe de altă parte studierea funcţiunilor acestor formaţiuni. Astfel, printre altele s-a putut preciza rolul esenţial al ribozomilor în sintezele proteice, rolul enzimatic al mitocondriilor etc. Metodele de izolare a ARN şi de cercetare a lor au fost studiate în alt capitol, de aceea nu vom reveni asupra lor.

Identificarea şi localizarea în celula întreagă a componenţilor chimici a preocupat de vreme îndelungată pe histologi care au creat, relativ de puţină vreme, o nouă ramură a ştiinţei lor : citochimia.

Citochimia acizilor ribonucleici

Scopul citochimiei este localizarea şi identificarea chimică a formaţiunilor prezente în celulele examinate. Deşi ramură relativ tînără a histologiei, noua disciplină a reuşit să progreseze cu paşi mari datorită adaptării la scopul propus a metodelor utilizate în chimia analitică şi creerii

Scanned with OKEN Scanner

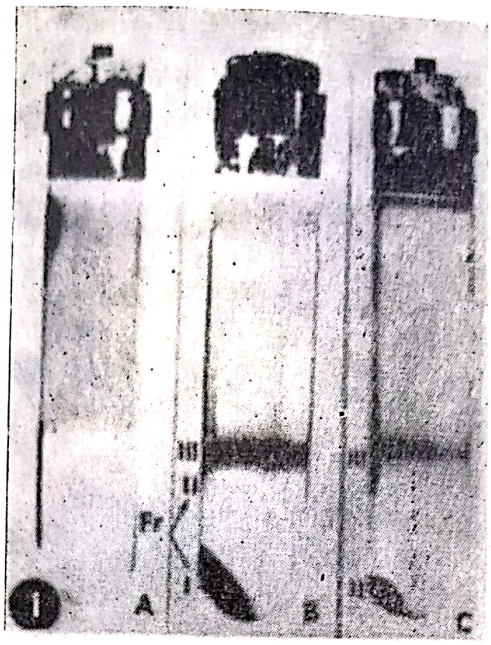


Fig. 109. — Sedimentarea microzomilor în gradient de densitate.
(*A*) înainte de ultracentrifugare, (*B*) după ultracentrifugare în gradient de Cs^+, și după ultracentrifugare în gradient de Mg^{++}. *Fr* = fracțiunile izolate (după Bergstrand și colab., 1964).

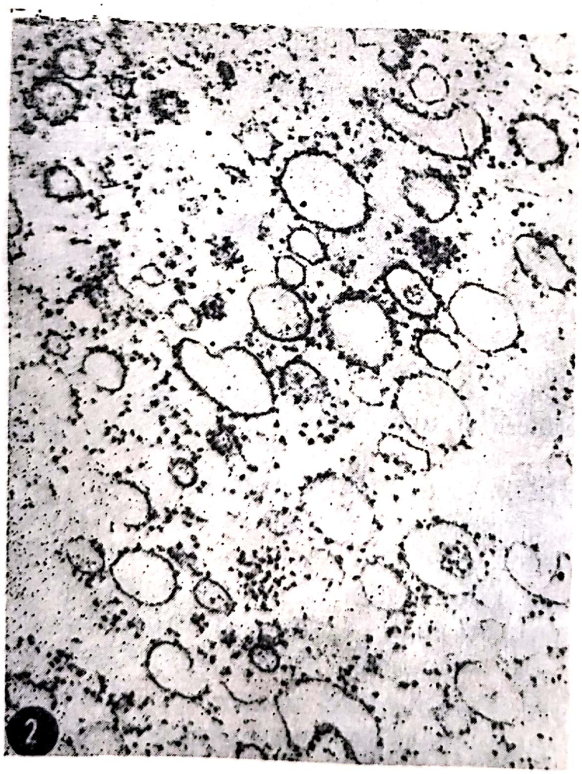


Fig. 110. — Fracția I obținută după ultracentrifugarea microzomilor. La microscopul electronic se observă vezicule cu granule (ribozomi) pe suprafață și ribozomi liberi (granule de ribonucleoproteină). Mărire 45 000 × (după Bergstrand și colab., 1964).

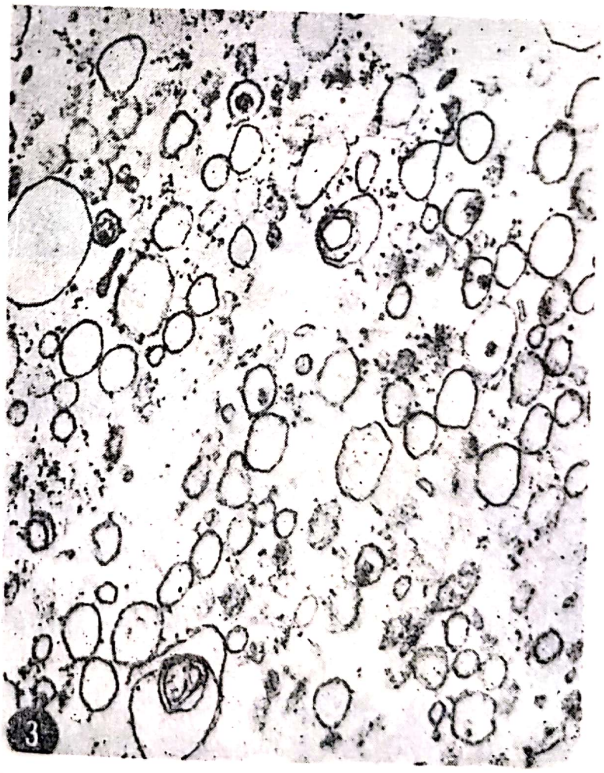


Fig. 111. — Fracția II. Vezicule netede fără particule de ribonucleoproteină. Mărire 45 000 × (după Bergstrand și colab., 1964).

Scanned with OKEN Scanner

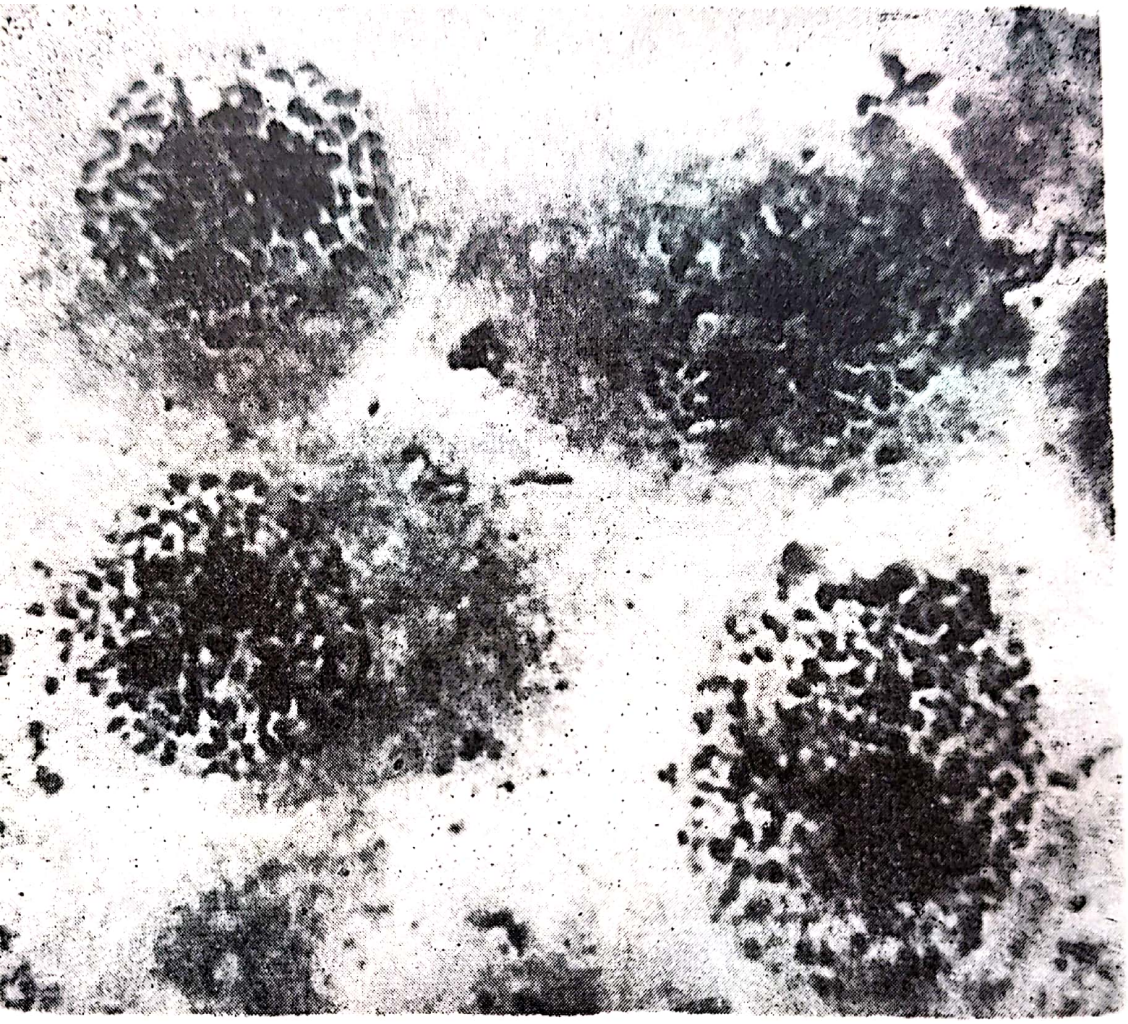


Fig. 112. — Autohistoradiografie. Celule HEP_2 infectate cu virusul Newcastle, tratate cu 2 μg/ml actinomicină D și H^3-uridină. Se pune în evidență în interiorul nucleului prezența nucleolului care a încorporat uridina marcată, ca și granulele care reprezintă provirusul (preparat original, Burducea și Bukrinskaia).

Scanned with OKEN Scanner

unor noi tehnici adecvate. Dacă identificarea şi localizarea ADN în interiorul celulei este mult mai exactă şi a fost uşurată datorită reacţiei Feulgen, precizarea acestor parametri în cazul ARN este mult mai dificilă şi mai puţin exactă. Identificarea, detectarea şi localizarea ARN în celulă aduce date preţioase nu numai în cazul cercetărilor de histologie pură, dar şi în cazul studiilor de fiziologie normală şi patologică celulară, în cadrul infecţiei celulare datorită bacteriilor, virusurilor, paraziţilor etc.

Cercetarea ARN în interiorul celulei poate fi realizată astăzi prin trei metodei şi anume : cu ajutorul tehnicilor de citochimie, cu ajutorul spectrofotometriei şi cu acel al izotopilor radioactivi.

Ca în toate tehnicile de citochimie şi în cazul acizilor nucleici fixarea joacă un rol de primă importanţă. În adevăr, utilizarea unui amestec fixator neadecvat conduce la o difuzare a substanţei căutate sau chiar la solubilizarea ei cu dispariţia parţială sau totală din celulă. În cazul acizilor nucleici, fixarea dezoxiribonucleoproteinelor pare mai uşoară decît a ribonucleoproteinelor, fapt datorit în bună parte structurii moleculare diferite a celor doi compuşi. Este un lucru bine cunoscut că, în timp ce molecula de ADN este mai rigidă şi deci mai stabilă, datorită celor două lanţuri ce o constituie, molecula de ARN este mult mai instabilă, sensibilitatea sa fiind legată de constituţia unispiralată. Amestecurile fixatoare întrebuinţate pentru imobilizarea ribonucleoproteinelor în interiorul celulei sînt în general simple şi la un pH cît mai apropiat de neutralitate. Din acest ultim punct de vedere, s-a recunoscut că un amestec prea acid (sub pH 3,5) antrenează dezintegrarea nucleoproteinei cu pierderea acidului nucleic. Inconveniente similare prezintă şi utilizarea alcoolului singur : se obţine aceeaşi dezintegrare a complexului şi precipitarea acidului nucleic. Este cunoscut faptul că ARN precipită în prezenţa alcoolului, proprietate întrebuinţată în cursul purificării acestui compus. În condiţiile impuse de tehnicile histologice, acest precipitat se poate redizolva în unul din solvenţii utilizaţi, ceea ce antrenează pierderea iremediabilă a acidului nucleic. Cu toate acestea, alcoolul este întrebuinţat în lichidele fixatoare ale ribonucleoproteinei, dar niciodată singur, ci amestecat cu alţi agenţi ca formolul, acidul acetic, sublimatul etc. Pentru anumite scopuri speciale (de ex. cînd preparatul este supus decalcificării) se adaugă acetat de lantan într-o concentraţie finală de 0,05 M, care are rolul de a insolubiliza ARN.

Dintre amestecurile fixatoare utilizate în histologie, unele sînt improprii fixării în condiţii optime a ribonucleoproteinelor, rezultatele obţinute fiind mediocre în ceea ce priveşte colorarea elementelor interesate. Printre aceste amestecuri, Lison (1953) semnalează fixatorii Bouin, Carnoy, Zenker, formolul pur etc. ; în schimb recomandă un fixator compus din alcool-formol-acid acetic (85 : 10 : 5).

Metoda de punere în evidenţă a ribonucleoproteinelor pe secţiunile de ţesuturi utilizate astăzi în mod curent este aceea pusă la punct de Brachet (1940). Ea constă în colorarea preparatelor cu amestecul lui Unna-

Scanned with OKEN Scanner

Pappenheimer, compus din pironină şi verde de metil. Acest amestec colorează în mod electiv ARN în roşu (pironina) şi ADN în verde închis (verde de metil). Cu toată această proprietate, rezultatele metodei nu pot fi luate în consideraţie decît după tratarea unui preparat martor cu RN-ază.

Numai în cazul în care formaţiunile studiate, pironinofile, îşi pierd afinitatea faţă de acest colorant după tratarea cu nucleaza se poate afirmă că ele conţin ribonucleoproteine.

Specificitatea metodei lui Brachet a fost şi este încă mult discutată ; completarea coloraţiei cu digestia nucleazică îi creşte într-o oarecare măsură specificitatea. Este de remarcat că o serie de formaţiuni sau substanţe intracelulare sînt colorate de pironină sau de verdele de metil.

Încă din primele sale cercetări, Brachet a constatat existenţa unui oarecare paralelism între conţinutul în ribonucleoproteine intracelulare şi intensitatea coloraţiei date de pironină. Acest fapt a determinat pe unii autori să considere metoda lui Brachet cantitativă. Cu toate aceste rezultate, tehnica este departe de a putea da indicaţiile cantitative pe care le dă reacţia nucleară Feulgen.

După Kurnick (1950), electivitatea coloraţiei lui Brachet depinde şi de gradul de polimerizare a acizilor nucleici. În timp ce ADN, sub forma sa înalt polimerizată, se colorează cu verdele de metil, acelaşi compus depolimerizat însă de agenţi chimici sau fizici, este colorat în roşu de pironină. Pe de altă parte, Pollister (1950) constată că ARN înalt polimerizat este colorabil cu ajutorul verdelui de metil.

Variaţiile de pH sînt de asemenea de mare importanţă în afinitatea formaţiunilor celulare pentru colorantul lui Unna. Astfel, Gerola şi Vannini (1949) observă că variaţiile de pH de la 1,5 la 11,5 determină o variaţie a afinităţii celulare de la totală pentru pironină, la totală faţă de verdele de metil.

În cele arătate mai sus se rezumă unele din cauzele pentru care coloraţia preconizată de Brachet, pentru punerea în evidenţă şi identificarea acizilor nucleici intracelulari, trebuie executată şi interpretată cu toate precauţiile şi cu toate prudenţa.

Este demn de reamintit că metoda lui Brachet este recomandată pentru punerea în evidenţă a ARN. Pentru depistarea ADN, coloraţia cu verde de metil nu poate fi comparată nici ca selecţie, nici ca specificitate, cu metoda lui Feulgen. Pentru acest motiv identificarea dezoxiribonucleoproteinelor în cazul tehnicii lui Brachet prin proba dezoxiribonucleazei nu-şi mai găseşte utilitatea.

Ribonucleaza are o acţiune electivă, specifică de depolimerizare a ARN, lăsînd intacte moleculele de ADN. Din păcate, multe preparate de RN-ază, insuficient purificate, conţin urme de DN-ază ca impuritate. Datorită acestui inconvenient, specificitatea sa este pierdută. Pentru a suprima acest inconvenient, se purifică RN-aza graţie proprietăţii sale speciale de termostabilitate. Prin încălzirea soluţiei de nucleză timp de

3 min la 100° sau 10 min la 80° se îndepărtează urmele de DN-ază, mult mai sensibilă faţă de acest tratament.

În afară de DN-ază, majoritatea preparatelor mai conţin unii fermenţi proteolitici care, la rîndul lor, pot în anumite condiţii falsifica rezultatele obţiute. Pentru aceste motive, astăzi, se găsesc în comerţ preparate de RN-ază purificate prin recristalizări repetate.

Pentru a îndepărta ARN din preparatele histologice se acoperă acestea cu soluţia de RN-ază care este lăsată să acţioneze în anumite condiţii. Condiţiile optime de digestie sînt îndelung discutate de autori: temperatura cea mai favorabilă pare a fi situată între 55 şi 60°, deşi limitele de acţiune găsite au fost între 40 şi 70°; pH-ul cel mai convenabil al soluţiei este punctul de neutralitate, dar soluţii al căror pH este cuprins între 5 şi 8 sînt de asemenea active; durata de acţiune variază între 30 şi 90 min. Pe preparatul supus acţiunii RN-azei formaţiunile pironinofile trebuie să-şi piardă această afinitate. Pentru controlul specificităţii acţiunii nucleazei, este indispensabilă confecţionarea unui preparat de control, tratat în aceleaşi condiţii, adică supus unei soluţii cu acelaşi pH şi la aceeaşi temperatură, însă în absenţa RN-azei. Uneori însă ARN este solubilizat şi în aceste condiţii, ceea ce antrenează pierderea pironinofiliei formaţiunilor studiate şi deci obţinerea unor date eronate.

Rolul fixatorului care a servit la prepararea pieselor este hotărîtor în eficacitatea tratamentului cu RN-ază şi deci, în esenţă, în identificarea ARN. Din cercetările lui Stowell şi Zorzoli (1947) rezultă că după fixare cu formol, alcool simplu sau asociat cu sublimat, acetonă sau amestecul lui Carnoy, RN-aza acţionează chiar în cantităţi mici (0,001 mg/ml), în timp ce utilizarea altor fixatori îngreunează mult sau chiar împiedică total activitatea enzimei.

Considerentele de mai sus, ca şi altele de mai mică importanţă, îl fac pe Lison (1953) să afirme că „un rezultat negativ în aplicarea testului cu ribonuclează nu este semnificativ", deoarece „nesuprimarea pironinofiliei prin ribonuclează este o prezumţie, dar nu o dovadă a absenţei acidului ribonucleic". Or, aşa cum am arătat mai sus, simpla colorare cu amestecul lui Unna este lipsită de specificitate în privinţa identificării acizilor nucleici. Tehnica lui Brachet cîştigă din acest punct de vedere prin introducerea preparatului martor supus acţiunii RN-azei. Cu toate acestea, pentru argumentele enumerate mai sus, metodele citochimice de localizare a ARN, dintre care coloraţia lui Brachet, considerată astăzi cea mai reproductibilă, trebuie executată cu toate precauţiunile şi interpretată cu toată prudenţa.

Proprietatea pe care o au acizii nucleici de a absorbi foarte puternic RUV în regiunea lungimii de undă de 2 600 Å a fost utilizată de Caspersson (1939 şi 1941) pentru a pune în evidenţă prezenţa acestor compuşi în interiorul celulei. Metoda imaginată de acest autor are şi avantajul de a aduce şi rezultate de ordin cantitativ. Absorbţia RUV este datorită prezenţei în molecula acizilor nucleici a bazelor purinice şi pirimidinice,

Scanned with OKEN Scanner

care au o bandă puternică de absorbţie la 2 600 Å. Aceasta face ca spectrele de absorbţie să nu fie caracteristice pentru un acid sau celălalt, ambii (ARN şi ADN) avînd maximul de absorbţie la 2 600 Å, iar curbele în totalitatea lor fiind superpozabile. De la început reiese deci că tehnica lui Caspersson, deşi extrem de precisă, este în mare măsură lipsită de specificitate, deoarece nu poate identifica care acid nucleic este prezent în formaţiunea studiată. Acest fapt implică tratarea preparatelor cu nucleazele specifice, dar cu acestea se introduc şi erorile datorite factorilor discutaţi mai înainte.

Tehnica lui Caspersson comportă o aparatură complicată şi costisitoare, datorită faptului că întreaga optică trebuie construită din cuarţ şi corectată pentru lungimile de undă mici.

Procedeul lui Caspersson constă în examinarea preparatului în lumină ultravioletă cu ajutorul unui microscop special cu optica de cuarţ. Determinarea poate fi făcută fie prin aprecierea directă, spectrofotometrică, a absorbţiei, fie prin obţinerea unei fotografii a formaţiunii interesate şi fotometrarea ulterioară a clişeului. În primul caz, se proiectează imaginea obiectului direct pe o celulă fotoelectrică sensibilă la lungimea de undă de 2 600 Å şi se determină valoarea absorbţiei faţă de o regiune martor. Preparatul fiind luminat cu un fascicul de RUV, selectat la 2 600 Å cu ajutorul unui monocromator, toate formaţiunile ce conţin acizi nucleici vor prezenta un grad mai mare sau mai mic de absorbţie, în funcţie de concentraţia acestui compus. Prin obţinerea unei fotografii, în varianta a doua a tehnicii, se înregistrează pe clişeu înnegririle specifice, care sînt strict dependente de coeficientul de absorbţie al preparatului. Determinarea gradului de înnegrire, cu ajutorul unui fotometru, indică de asemenea valoarea absorbţiei, raportată şi în acest caz la o zonă martor. Obţinerea acestei zone „blanc" este realizată, în cercetările lui Pollister şi Ris (1947), prin tratarea preparatului cu o soluţie 0,3 M de acid tricloracetic timp de 15 min la 90°. Acest tratament înlătură acizii nucleici din formaţiunea histologică, care examinată a doua oară va constitui „blanc"-ul.

Dacă metoda imaginată de Caspersson a adus multe servicii în localizarea histologică a acizilor nucleici, totuşi şi ea este departe de a fi perfectă şi la adăpost de unele observaţii critice. Astfel, în cazul determinărilor realizate pe celule vii, unde s-ar putea obţine date extrem de importante, metoda îşi pierde mult din valoare, deoarece obţinerea în acest caz a unui „blanc" de comparare este imposibilă. În afară de aceasta, o serie de substanţe chimice prezintă în zona lungimii de undă de 2 600 Å sau în regiunile învecinate maxime de absorbţie care falsifică interpretarea. Printre aceşti compuşi, citäm, în afara acizilor nucleici, nucleotidele, cozimaza, cofermentul lui Warburg, flavin-nucleotidele, acidul uric, guanina, tiamina, carboxilaza etc. Pentru a înlătura aceste substanţe, Panijel (1951) tratează la rece preparatul înainte de examinare cu o soluţie de 5% de acid tricloracetic care, în 15-20 min, extrage compuşii absorbanţi, cu excepţia acizilor nucleici.

Scanned with OKEN Scanner

Prezenţa proteinelor în interiorul celulei examinată poate constitui de asemenea o sursă de erori în determinările spectrofotometrice. În adevăr, maximul de absorbţie al acestor compuşi este situat, datorită triptofanului şi tirozinei, într-o regiune învecinată celei a acizilor nucleici, şi anume la 2 800 Å. În mod obişnuit însă proteinele interferează din acest punct de vedere, prea puţin cu acizii nucleici, deoarece valoarea absorbţiei lor este de aproximativ 40 de ori mai redusă, la concentraţii egale. Totuşi, în cazul studierii unei formaţiuni care cuprinde un exces de proteine faţă de o cantitate redusă de acizi nucleici, rezultatele ar putea fi supuse erorilor.

În general, metoda preconizată de Caspersson este caracterizată prin marea sa precizie, dacă bineînţeles se iau toate măsurile de precauţiune pentru a înlătura sursele de erori. Cu toate acestea, metoda comportă o aparatură costisitoare, care îi limitează întrebuinţarea.

O metodă relativ recentă de localizare intracelulară a acizilor nucleici este aceea a autohistoradiografiei. Imaginată şi realizată încă din 1924 de Lacassagne (1924), această metodă nu a fost pe deplin extinsă şi fructificată decît o dată cu descoperirea izotopilor radioactivi şi utilizarea lor în biologie. Imaginea autoradiografică a unui ţesut se obţine aşezînd peste secţiunea histologică o peliculă fotosensibilă, care este impresionată după un anumit timp de emisia compusului marcat (fig. 112). După developare se compară, sub microscop, fotografia astfel obţinută cu secţiunea histologică colorată. În acest mod, localizarea elementului chimic căutat este extrem de precisă. În cazul cercetării acizilor nucleici se oferă celulei, pentru a fi utilizat în cursul sintezei acestor compuşi, fosfor radioactiv sub forma unui fosfat, uşor asimilabil. În procesul de sinteză noile molecule de acizi nucleici vor incorpora acest fosfor, care apoi va putea fi pus în evidenţă prin procedeul descris mai sus. Datorită însă faptului că fosforul intră în constituţia moleculelor ambilor acizi nucleici, ceea ce împiedică o identificare a lor, s-a căutat să se pună la punct metode diferenţiale. În acest scop se încorporează precursori specifici ai fiecărui tip de moleculă. Astfel de exemplu, în cazul ARN se utilizează acidul orotic (Hurlbert şi Potter, 1952), iar în cazul ADN, timidina (Friedkin şi colab., 1956). În acelaşi scop se pot utiliza precursori marcaţi cu tritiu (Eidinoff şi colab., 1951) sau adenină marcată cu C^{14} (Brachet şi Ficq, 1956).

Pe lîngă faptul că această metodă, care nu şi-a spus încă ultimul cuvînt, permite localizarea acizilor nucleici în celulă şi obţinerea de date noi în legătură cu metabolismul acestor compuşi, ea deschide noi drumuri în studiul virusurilor. În acest caz se poate urmări pe de o parte drumul parcurs de virus (prin acidul său nucleic marcat) în interiorul celulei, iar pe de altă parte evoluţia metabolismului celulei infectate prin marcarea prealabilă a compuşilor acesteia.

Scanned with OKEN Scanner

Întrebuinţarea izotopilor radioactivi în localizarea acizilor nucleici pe preparatele de histologie are, pe lîngă avantaje, o serie de neajunsuri, dintre care în primul rînd trebuie luate în considerare cele ce decurg, în general, din utilizarea izotopilor şi care implică precauţii speciale.

Metoda nu permite întodeauna obţinerea de date cantitative asupra compuşilor studiaţi. Deşi pe preparatele fotografice căpătate se pot face unele determinări fotometrice, totuşi aceste rezultate nu par a da satisfacţie majorităţii cercetătorilor.

Durata de expunere a preparatelor necesită uneori perioade de timp îndelungate, care se pot extinde de la zile la luni. Cînd izotopul emite radiaţii slabe, cum este cazul tritiului, expunerea necesită o perioadă de cîteva luni. Este de la sine înţeles că acestă durată excesivă pînă la obţinerea rezultatelor, este departe de a satisface spiritul de curiozitate al cercetătorului. Nu trebuie omis faptul că, în cazul unor expuneri de durată mare, emulsia pusă în contact cu preparatul trebuie ferită în mod eficace contra radiaţiilor cosmice, care pot provoca importante perturbări prin interferirea cu efectul izotopului. Pe de altă parte expunerile lungi reprezintă şi un impediment grav în obţinerea unei rezoluţii satisfăcătoare.

Allen E. H., Glassman E., Schweet R. S. (1960 *a*), J. biol. Chem., **235**, 1 061.
Allen E. H., Glassman E., Cordes E., Schweet R. S. (1960 *b*), J. biol. Chem., **235**,1 068.
Allfrey V. G., Mirsky A. E. (1957), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **43**, 589.
Allfrey V. G., Daly M. M., Mirsky A. E. (1953), J. gen. Physiol., **36**, 173.
Altmann H. W. (1952), Naturwissenschaften, **39**, 348.
Anderson N. G. (1956), în *Physical techniques in biological research*, Academic Press, New York, vol. III, p. 299.
Aronson A. I., McCarthy B. I. (1961), Biophys. J., **1**, 215.
Borrel A. (1903), Ann. Inst. Pasteur, **17**, 81, 122.
Berg P., Lagerkvist U. (1962), în *Acides ribonucléiques et les polyphosphates*, C.N.R.S., Paris, p. 259.
Berg P., Lagerkvist U., Dickemann M. (1962), J. mol. Biol., **5**, 159.
Berg P., Ofengand E. J. (1958), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **44**, 78.
Bergstrand A., Dallner G., Orrenius S. (1964), III-a Conf. europ. micr. electr., Praga, 415.
Bernhard W., Haguenau F., Oberling C. (1952), Experientia, **8**, 58.
Bernhard W., Gautier A., Rouiller C. (1954), Arch. Anat. micr. Morphol. exp., **43**, 236.
Berthet J., Duve C. (1951), Biochem. J., **50**, 174.
Bielka H., Graffi A. (1959), Acta biol. med. germ., **3**, 515.
Björkman N. (1964), III-a Conf. europ. micr. electr., Praga, 35.
Boedtker H., Möller W., Klemperer E. (1962), Nature, **194**, 444.
Brachet J., *Embryologie chimique*, Edit. Desoer, Liège.
Brachet J. (1940), C. R. Soc. Biol., **133**, 88.
Brachet J. (1941), Arch. biol. (Liège), **53**, 207.
Brachet J. (1949), Publ. staz. zool., Napoli, **21**, 77.
Brachet J. (1961), în *The cell*, Academic Press, New York, vol. II, p. 771.
Brachet J., Jeener R. (1944), Enzymologia, **13**, 196.
Brachet J., Ficq A. (1956), Arch. biol. (Liège), **67**, 431.

Scanned with OKEN Scanner

Brenner S., Jacob F., Meselson M. (1961), Nature, **190**, 576.
Brown G. L., Callan H. G., Leaf G. (1950), Nature, **165**, 600.
Brown G. L., Kosinski Z., Carr C. (1962), în *Acides ribonucléiques et les polyphosphates*, C.N.R.S., Paris, p. 183.
Cantoni G. Z. (1962), în *Acides ribonucléiques et les polyphosphates*, C.N.R.S., Paris, p. 201.
De Carvalho S. (1960), J. Lab. clin. Méd., **55**, 694.
Caspersson T. (1939), Arch. exp. Zellforsch., **22**, 650.
Caspersson T. (1941), Naturwissenschaften, **28**, 33.
Caspersson T. (1947), Symposia Soc. exp. Biol., **1**, 127.
Caspersson T. (1950), *Cell growth and cell function*, Edit. Norton, New York.
Caspersson T., Schultz J. (1939), Nature, **143**, 602 şi 609.
Claude A. (1943), Biol. Symposia, **10**, 3.
Cox R. A., Arnstein R. V. (1963), Biochem. J., **89**, 574.
Le Clerc J. (1954), Experientia, **10**, 251.
McClintock B. (1934), Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., **21**, 294.
Crick F. H. S. (1958), Symposia Soc. Exp. Biol., **21**, 138.
Davern C. I., Meselson M. (1960), J. mol. Biol., **2**, 153.
Dounce A. L., Witter R. F., Monty K. J., Pate S., Cottone M. A. (1955), J. biophys. biochem. Cytol., **1**, 139.
Duryee W. R. (1950), Ann. N. Y. Acad. Sci., **50**, 920.
Eidinoff M. L., Fitzgerald P. J., Simmel E. B., Knoll J. E. (1951), Proc. Soc. exp. Biol. Med., **77**, 225.
Ekholm R., Hyden H. (1964), III-a Conf. europ. microelectr. Praga, 37.
Estable C., Sotelo J. R. (1951), Inst. Invest. Cient. biol. Publ., **1**, 105.
Estable C., Sotelo J. R. (1954), în *Fine structure of cell*, Simp. Leida, 170.
Frederic J. (1955), Ann. N. Y. Acad. Sci., **58**, 1 246.
Friedkin M., Tilson D., Roberts D. W. (1956), J. biol. Chem., **220**, 627.
Frisch-Niggemeyer W. (1956), Nature, **178**, 307.
Gale E. F., Folkes J. P. (1954), Nature, **173**, 1 223..
Ganguli J., Denel H. J. (1953), Nature, **172**, 120.
Garnier C., Bouin P. (1897), Bibl. Anat., **5**, 276.
Gerola F. M., Vannini E. (1949), Boll. Soc. ital. Biol. sper,. **25**, 644.
Gierer A., (1957), Nature, **179**, 1 297.
Gierer A. (1963), J. mol. Biol., **6**, 148.
Goldstein L., Plaut W. (1955), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **41**, 874.
Goldstein L., Micou J. (1959), J. biophys. biochem. Cytol., **6**, 301.
Gomatos P. J., Tamm J. (1963), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **49**, 707.
Green M., Hall B. (1961), J. Biophys., **1**, 517.
Gros F., Hiatt H., Gilbert W., Kurland C. G., Risebrough R. W., Watson J. D. (1960), Nature, **190**, 581.
Gros F., Naono S., Hayes D., Hayes F., Watson J. D. (1962), în *Acides ribonucléiques et les polyposphates*, C.N.R.S., Paris, p. 437.
Hall B. D., Doty P. (1959), J. mol. Biol., **1**, 111.
Hall B. D., Doty P. (1962), în *Microsomial particles and protein synthesis*, Pergamon Press, New York, p. 27.
Hagan W. A. (1922), J. exp. Med., **36**, 711.
Hall B. D., Spiegelman S. (1961), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **47**, 197.
Hämmerling J., Stich H. (1956), Z. Naturforsch., **11 b**. 158, 162.
Harrison M. F. (1953), Proc. Roy. Soc., **141**, 203.
Hays E. F., Simmons N. S., Beck W. S. (1957), Nature, **180**, 1 419.
Hecht L. I., Stephenson M. L., Zamecnik P. C. (1959), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **45**, 505.
Heitz E. (1931), Planta, **12**, 775.
Helmkamp G. K., Ts'o P. O. P. (1961), J. amer. chem. Soc., **83**, 138.
Hershey A. D. (1953), J. gen. Physiol., **37**, 1.
Hesin R. B. (1954), Biohimiia, **19**, 407.
Hoagland M. E., Keller E. B., Zamecnik P. C. (1956), J. biol. Chem., **221**, 15.

Scanned with OKEN Scanner

Potter V. R., Elvehjem C. A. (1936), J. biol. Chem., **114**, 495.
Preiss J., Berg P., Ofengand E. J., Bergmann F. H., Dickmann M. (1955), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **45**, 319.
Rhodin J. (1961), J. biophys. biochem. Cytol., **11**, 492.
Rich A., Watson J. I. (1954), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **40**, 759.
Riley M., Pardee A. B., Jacob F., Monod J. (1960), J. mol. Biol., **2**, 216.
Schotz M., Rice L. I., Alfin-Slater R. B. (1953), J. biol. Chem., **204**, 19.
Semancik J. S., Bancroft J. B. (1964), Virology, **22**, 33.
Shaver J. R., Brachet J. (1949), Experientia, **5**, 235.
Siekevitz P. (1955), J. biophys. biochem. Cytol., **1**, 477.
Siekevitz P., Palade G. E. (1960), J. biophys. biochem. Cytol., **7**, 631.
Sirlin J. L. (1960), în *The cell nucleus*, Edit. Butterworths, Londra, p. 35.
Sjöstrand F. S., Hanzon V. (1954), Exp. Cell Res., **7**, 393.
Smetana K. (1964), III-a Conf. europ. micr. electr. Praga, 33.
Spirin A. S. (1962), în *Acides ribonucléiques et les polyphosphates*, C.N.R.S., Paris, p. 73.
Spirin A. S. (1963), în *Progress in nucleic acids research*, Academic Press, New York, vol. I, p. 301.
Stern H., Allfrey V. G., Mirsky A. E., Saetren H. (1952), J. gen. Physiol., **35**, 559.
Stich H., Hämmerling J. (1953), Z. Naturforsch., **8** b, 329.
Storey R. H., Wish L., Furth J. (1951), Cancer Res., **11**, 943.
Stowell R. E., Zorzoli A. (1947), Stain techn., **22**, 51.
Torgerson O., Walaas W., Ostgaard A. (1952), Acta path. microbiol., scand., **93**, suppl., 168.
Tsugita A., Gish O. T., Joung J., Fraenkel-Conrat H., Knight C. A., Stanley W. M. (1960), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **46**, 1 463.
Vanderhaeghe F. (1957), Teză, Fac. Științe, Bruxelles.
Vincent W. S. (1952), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **38**, 139.
Vincent W. S. (1955 *a*), Biol. Bull., **109**, 353.
Vincent W. S. (1955 *b*), Int. Rev. Cytol., **4**, 269.
Volkin E., Astrachan L. (1956), Virology, **2**, 149.
Watson J. D. (1963), Science, **140**, 3 562.
Weiss S. B., Acs G., Lipmann F. (1958), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **44**, 189.
Wildy P., Horne R. W. (1963), în *Progress in medical virology*, vol. 5.
Zamecnik P. C., Keller E. B. (1954), J. biol. Chem., **209**, 337.
Zamecnik P. C., Stephenson M. L., Hecht L. I. (1958), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **44**, 73.
Zilling W., Schactschabel D., Krone W. (1960), Z. Physiol. Chem., **318**, 100.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 7

EXTRACȚIA ȘI FRACȚIONAREA ACIZILOR RIBONUCLEICI

Extracţia acizilor ribonucleici

În general toate operaţiile tehnice care se utilizează pentru izolarea ARN din diferite surse biologice modifică configuraţia macromoleculelor acestui compus. Desigur, extracţia ideală ar fi aceea care ar conduce la un ARN a cărui structură să rămînă identică cu aceea pe care a avut-o în interiorul materialului biologic înainte de extracţie. Or, simpla separare a acidului nucleic de infrastructurile de care a fost legat determină în primul rînd ruperea legăturilor care i-au conferit o anumită structură terţiară macromoleculei în cadrul nucleoproteinei din care a făcut parte. Multiplele tratamente la care este supus în timpul extracţiei, contactul său cu soluţii ce conţin diferite substanţe, ca şi forţa ionică a acestora sînt tot atîtea cauze care modifică în continuare configuraţia moleculelor de ARN, în timpul şi după extracţie.

Ceea ce interesează în mod deosebit în cazul unei extracţii de ARN este obţinerea unui produs cu un înalt grad de integritate structurală, astfel încît el să păstreze cît mai mult cu putinţă din proprietăţile iniţiale fizico-chimice şi biologice specifice. Pentru unii acizi nucleici extraşi din bacterii sau virusuri acest deziderat a devenit astăzi posibil. Astfel, dacă ne referim numai la virusuri constatăm că numărul acizilor nucleici infectanţi extraşi din virusuri (şi din celulele infectate cu virusuri) a crescut în mod impresionant. În adevăr, este mai uşor astăzi de a enumera virusurile din care nu s-au putut izola acizi nucleici activi, decît pe acelea pentru care s-a demonstrat infectivitatea acizilor lor nucleici.

Este semnificativ faptul că activitatea biologică a unor acizi nucleici este întrebuinţată ca test pentru a cunoaşte valoarea metodelor de extracţie, în special în faza de primă încercare a unei noi variante. Obţinerea unui acid nucleic biologic activ este o dovadă că structura sa nativă a fost bine conservată în timpul diferitelor operaţii ale izolării. Această tehnică este curent utilizată în laboratorul nostru atunci cînd o nouă metodă este încercată sau chiar cînd produsele chimice ce intră în procesul de extracţie nu au fost încă probate. Pe de altă parte, adaosul în timpul încer-

Scanned with OKEN Scanner

cării unei noi metode de extracţie a unui acid nucleic a cărui activitate biologică a fost anterior controlată, permite aprecierea calităţii extracţiei. Păstrarea activităţii biologice şi după extracţie a acidului nucleic adăugat ca „indicator" dovedeşte că metoda încercată este bună.

Din păcate, testul biologic, atît de sensibil şi frecvent întrebuinţat în cazul acizilor nucleici infectanţi extraşi din virusuri nu poate fi aplicat şi în cazul acizilor nucleici extraşi din ţesuturile organismelor superioare deoarece activitatea biologică a acestor compuşi nu a fost încă suficient de bine stabilită. În aceste cazuri, aprecierea calităţii produsului se face cu ajutorul unor date fizico-chimice care pot stabili integritatea sau alterarea structurii ARN extraşi. Aceste date pot fi obţinute prin mai multe metode care merită să fie amintite : metoda spectrofotometrică, ultracentrifugarea, centrifugarea în gradient de densitate şi, î ultimul timp, cromatografia pe coloană care a adus unele rezultate extrem de importante.

Etapele extracţiei. Operaţiie de extragere a ARN din ţesuturi, bacterii sau virusuri se desfăşoară în general în patru etape principale :

a) Distrugerea citologică a materialului biologic.
b) Solubilizarea nucleoproteinelor.
c) Deproteinizarea acidului ribonucleic.
d) Purificarea acidului ribonucleic.

Pentru distrugerea celulelor se întrebuinţează de obicei omogenizatoare speciale. Ţesuturile animale sînt broiate cu omogenizatoare cu lame metalice sau de tip Potter. Alegerea tehnicii se face în funcţie de natura ţesutului care este supus extracţiei. În acelaşi scop se poate întrebuinţa şi mojararea cu nisip sau un alt procedeu adecvat. Distrugerea corpilor microbieni prezintă însă uneori dificultăţi datorită consistenţei pereţilor bacterieni. Consecinţele utilizării aluminei la extracţia ARN mesager au fost discutate o dată cu expunerea rezultatelor fracţionării pe coloană a acestui produs.

Ribonucleoproteinele (RNP) se deosebesc de dezoxiribonucleoproteine (DNP) prin solubilitatea lor diferită în soluţiile saline neutre. În soluţie de NaCl 0,14 M (concentraţie fiziologică) RNP sînt solubile în timp ce DNP insolubile. În concentraţii ridicate de NaCl însă, (1—2 M) rolurile se inversează. Pe aceste proprietăţi se bazează extracţia selectivă a celor două nucleoproteine.

Există diverse metode de disociere la care pot fi supuse nucleoproteinele pentru a elibera acidul nucleic. Principiul lor este în linii mari acelaşi. Cu ajutorul unui agent chimic nucleoproteinele se separă în cele două componente : acid nucleic şi proteină. Aceasta din urmă este trecută într-o stare insolubilă sub care formă este apoi îndepărtată prin centrifugare sau filtrare. Dintre agenţii chimici întrebuinţaţi în scopul arătat mai sus se pot menţiona : unele săruri, fenolul şi unii detergenţi. Pentru extracţia de ARN etapa de disociere a nucleoproteinelor este cea mai importantă. Atît randamentul extracţiei cît şi puritatea produsului obţinut

Scanned with OKEN Scanner

depind în mare măsură de felul în care s-a realizat desfacerea nucleoproteinei. De altfel diferitele metode de extracție a ARN se pot grupa în cîteva categorii mai mari după agentul de disociere utilizat. O primă categorie cuprinde metodele relativ mai vechi de extracție a ARN și se bazează pe întrebuințarea unor săruri ca : NaCl, $(NH_4)_2$ SO_4, clorhidratul de guanidină etc. În marea lor majoritate aceste metode au fost astăzi abandonate, locul lor fiind luat de altele mai recente care sînt mult mai avantajoase. Acestea din urmă se împart în trei categorii : *a*) metode ce întrebuințează fenolul, *b*) metode ce întrebuințează detergenții și *c*) metode ce întrebuințează simultan atît fenolul cît și un detergent oarecare.

Atît fenolul cît și detergenții au proprietatea de a conserva structura macromoleculei de ARN, denaturînd în același timp proteinele. Extractele de ARN obținute cu ajutorul lor sînt pure iar conținutul lor în proteine este foarte scăzut.

Purificarea finală a ARN se realizează prin precipitarea lui cu alcool și redizolvare în NaCl 0,14 M. Operația aceasta se poate repeta dacă este cazul, iar moleculele mici din extract care impurifică acidul nucleic se îndepărtează prin dializă. Din păcate polizaharidele care contaminează uneori aceste soluții sînt greu de înlăturat. Procedeele folosite în acest scop par să afecteze structura macromoleculelor de ARN.

Metode de extracție : a) *Extracția cu săruri.* Davidson și Waymouth (1944) au descris o metodă de extracție bazată pe proprietatea NaCl 10% de a solubiliza la cald ARN. Materialul care urmează să fie supus extracției se omogenizează cu multă atenție și apoi se încălzește timp de 30 min la 100°C suspendat într-o soluție de NaCl 10%. Extractul obținut se filtrează de mai multe ori, iar ARN se precipită cu alcool. Metoda a fost întrebuințată de numeroși cercetători pentru extragerea ARN din diferite surse biologice. O metodă oarecum asemănătoare a fost descrisă de Kerr și Seraidorian (1949) care întrebuințează însă soluția de NaCl rece.

Volkin și Carter (1951) recomandă să se facă extracția ARN cu ajutorul clorhidratului de guanidină. Produsul obținut este deosebit de pur iar randamentul obținut este între 20 și 30%.

b) *Extracția cu detergenți.* Întrebuințarea detergenților anionici de tipul dodecil-sulfatului de sodiu a reprezentat un important progres realizat pe calea obținerii unor acizi nucleici înalt polimerizați. În prezența lor, extracția se face mai rapid, randamentul este mult mai ridicat, iar produsul obținut mai pur.

Atît ARN cît și ADN au fost extrași din diferite țesuturi animale și vegetale, bacterii și virusuri cu ajutorul dodecil-sulfatului de sodiu.

Principiul pe care se bazează utilizarea unor detergenți este următorul : în prezența dodecil-sulfatului (0,5—2%) nucleoproteina suferă în prima fază o disociere datorită combinării selective a detergentului cu proteina bazică, iar în a doua fază, proteina eliberată este precipitată. Deoarece precipitarea proteinei are loc numai în prezența unei concentrații

Scanned with OKEN Scanner

crescute de NaCl extracţia acizilor ribonucleici cu detergenţi se face în două etape. În prima, concentraţia soluţiei este de 0,14 M NaCl, iar proteina este solubilizată şi disociată ; în a doua, are loc precipitarea proteinei datorită creşterii concentraţiei în NaCl a soluţiei.

Extracţia ARN din drojdie cu ajutorul dodecil-sulfatului cuprinde următoarele operaţiuni (Crestfield şi colab., 1955) : materialul se încălzeşte la 80—90° cîteva minute într-o soluţie de dodecil-sulfat de sodiu 2%, tamponată cu fosfat. După centrifugare, acidul nucleic se precipită cu alcool din supernatant, se spală de mai multe ori cu alcool se dizolvă în apă şi se centrifughează. Soluţia clară obţinută se aduce apoi la 1 M NaCl. După un anumit timp, la 0°C, ARN precipită sub forma unui gel care se separă prin centrifugare şi apoi se dizolvă. Soluţia se dializează şi se filtrează întrebuinţînd în acest scop celita şi apoi se liofilizează. Randamentul este 60—70%, iar produsul conţine mai puţin de 0,5% ADN şi 2% proteine. Coeficienţii de sedimentare cît şi de viscozitate a produsului astfel obţinut dovedesc că greutatea sa moleculară este ridicată.

Dodecil-sulfatul de sodiu a fost întrebuinţat şi pentru extracţia ARN infectant din VMT. Metoda preconizată în acest scop de Fraenkel-Conrat şi colab. (1957) se execută în modul următor : soluţia de virus în concentraţie de 1% cu pH 8,5 şi care conţine 0,0001 versen se încălzeşte la 50° timp de 5 min în prezenţa dodecil-sulfatului de sodiu a cărui concentraţie finală în soluţie este de 1%. După clarificare se răceşte la 26°C şi se aduce la 0,33% saturaţie de sulfat de amoniu. Proteina care precipită este separată prin centrifugare. Supernatantul se răceşte, iar ARN precipită încet. Precipitatul de acid nucleic, recoltat prin centrifugare, este dizolvat apoi într-o cantitate mică de apă şi reprecipitat cu două volume de alcool la care se adaugă cîteva picături de acetat de potasiu. Urmează apoi un nou ciclu de dizolvare — precipitare — dizolvare care se încheie cu o ultracentrifugare la 40 000 t/m timp de 2 ore.

c) *Extracţia cu fenol.* Spectrul cel mai larg de aplicare pentru obţinerea unui ARN înalt polimerizat şi înzestrat cu activitate biologică îl are metoda de extracţie cu fenol. Aplicată în 1956 de către Gierer şi Schramm (1956) pentru extracţia ARN infectant din VMT a fost adaptată şi pentru extracţia altor acizi nucleici din diferite surse. Metoda cu fenol a relevat faptul necunoscut pînă atunci că greutatea moleculară a ARN extraşi din diferite surse poate atinge valori de peste 1 milion. Din constatarea că acizii nucleici extraşi din unele virusuri au o activitate biologică remarcabilă, s-a dedus că extracţia fenolică are numeroase avantaje faţă de celelalte metode. În primul rînd, metoda cu fenol eliberează acizi nucleici a căror structură este respectată şi deci cea mai apropiată de aceea pe care o au în sursa din care au fost extraşi şi sînt în consecinţă înalt polimerizaţi.

Descoperirea gradului înalt de polimerizare a ARN a permis să se explice instabilitatea lor. Este cunoscut faptul că ARN infectanţi îşi pierd activitatea chiar la 0° şi pH 7 dacă sînt conservaţi mai multe ore

Scanned with OKEN Scanner

în aceste condiții. În același timp se observă scăderea greutății moleculare, ceea ce dovedește că depolimerizarea moleculelor de ARN are loc într-un interval de timp foarte scurt. După Alexander și colab. (1958) și Huppert și Sanders (1958) depolimerizarea poate fi preîntîmpinată numai dacă soluția de ARN este congelată rapid la -70° și conservată la această temperatură.

În principiu, metoda de extracție cu fenol este relativ simplă: materialul din care se extrage ARN este suspendat într-o soluție de NaCl 0,14 M, și apoi tratat cu un volum egal de fenol saturat cu apă. Amestecul se agită puternic un număr variabil de minute în funcție de materialul din care se extrage amestecul. Se centrifughează apoi pentru a separa faza fenolică de faza apoasă. Aceasta din urmă conține acidul nucleic aproape complet lipsit de proteine și polizaharide. Acidul dezoxiribonucleic prezent în materialul astfel tratat se găsește insolubilizat în sediment.

Pe scurt, metoda originală de extracție a ARN după Gierer și Schramm (1956) este următoarea:

La o soluție concentrată de virus purificat, suspendat într-un tampon fosfat 0,2 M, cu pH 7,3, se adaugă un volum egal de fenol saturat cu apă. Amestecul se agită puternic timp de 8 min. Faza apoasă care conține ARN este separată prin centrifugare și reextrasă de 2 ori consecutiv cu cîte un volum egal de fenol apos timp de 2 min de fiecare dată. Se elimină apoi fenolul din faza apoasă prin agitări succesive cu eter, repetate de 5—6 ori. Eterul se înlătură trecînd un curent de azot prin soluție. Soluția limpede care conține ARN este inoculată plantei pentru a se determina puterea sa infectantă. Toate operațiile se fac la 5°. Extracția durează în total 50 min. ARN astfel obținut este aproape complet deproteinizat: metodele chimice nu pot detecta proteine (mai puțin de 0,4%), iar metodele serologice arată că soluția conține mai puțin de 0,02% din proteinele native ale virusului mozaicului tutunului.

Tratamentul cu fenol determină denaturarea și precipitarea proteinelor; ele se regăsesc, în urma centrifugării, între faza fenolică și cea apoasă sub forma unui strat mai mult sau mai puțin compact. De obicei extracția cu fenol se repetă de trei ori pentru a obține un randament mai bun și un grad de puritate mai ridicat. Din soluție, ARN poate fi precipitat cu alcool sau cu NaCl 1 M și purificat în continuare prin precipitări și redizolvări repetate.

Polizaharidele care uneori impurifică soluția de ARN pot fi îndepărtate, după Kirby (1956), prin precipitarea lor cu metoxietanol. Procedeul nu pare a fi cel mai indicat deoarece, după cum arată Lascov și colab. (1959), în timpul acestei precipitări moleculele de ARN se depolimerizează. Adăugarea însă de NaCl pînă la concentrația de 3 M, în soluția în care se găsește acidul nucleic, determină formarea unui precipitat care conține polizaharidele și o mică cantitate din ARN. Polizaharidele astfel precipitate sînt îndepărtate prin centrifugare.

Scanned with OKEN Scanner

După cum am arătat mai sus, ARN extras cu fenol se prezintă într-un grad de puritate relativ ridicat. Majoritatea autorilor nu pot decela prezența proteinelor prin metodele uzuale de analiză. Unii autori însă, pun în evidență prezența acestei substanțe în cantități extrem de reduse. Blazsek și Bukaresti (1962) au aplicat metoda polarografică în detectarea urmelor de proteine existente în soluțiile de ARN extras prin diferite metode. După acești autori metoda polarografică depășește în sensibilitate celelalte metode întrebuințate pentru punerea în evidență a cantităților mici de proteine. Din datele obținute de ei rezultă în mod evident superioritatea metodei de extracție cu fenol față de celelalte metode, deoarece soluțiile de ARN extras prin această metodă conțin cantitatea cea mai mică de proteine.

Habermann (1959) semnalează prezența peptidelor puternic legate de acidul ribonucleic extras. Prezența acizilor aminați în soluțiile de ARN extras cu fenol a fost pusă în evidență pentru prima dată de Portocală, Boeru și Samuel (1960), cu ocazia cercetărilor întreprinse asupra infectivității acestui compus obținut din virusul gripal.

Analizat cu ajutorul ultracentrifugării, ARN se dovedește eterogen. După Laskov și colab. (1959) aproximativ 20% din moleculele ARN din ficat extras cu fenol au o constantă de sedimentare sub 13 *S*, și nu este precipitat cu NaCl 3 M. Pe de altă parte, acest acid nucleic precipitat cu NaCl se separă în două componente, una de 17 *S* și cealaltă de 25 *S*. Colter și Brown (1956) analizează în ultracentrifugă ARN extras din tumora Ehrlich și observă că acesta se separă în patru componente principale și anume : o componentă cu constantă de sedimentare 24 *S*, care reprezintă aproximativ 50% din ARN total, și alte trei componente cu constantele de sedimentare 6 *S*, 18 *S* și 21 *S*. Constante de sedimentare relativ apropiate au fost găsite și în cazul ARN extras din *E. coli* care se separă, după Littauer și Eisenberg (1959), în două componente mari, una caracterizată prin constantele 14 și 16 *S* și a doua prin 19—24 *S*. Aceste două componente reprezintă aproximativ 90% din ARN total. Majoritatea lucrărilor recente demonstrează că acest compus extras din *E. coli* cu fenol conține trei componente principale : prima componentă (4 *S*) reprezintă moleculele de ARN-*S* cu o greutate moleculară mică, iar celelalte două componente (16 și 23 *S*), cu greutate moleculară ridicată, reprezintă ARN ribozomal.

Rezultatele ulterioare obținute de Harshaw și colab. (1962) arată că ARN extras cu fenol din celulele L conține trei componente, cu constante de sedimentare de 4 *S*, 18 *S* și 34 *S*. Același compus extras din celulele tumorii ascitice S178-Y conține patru componente (4 *S*, 18 *S*, 23 *S* și 32 *S*), iar cel din ficatul de șobolan trei (4 *S*, 22 *S* și 34 *S*). După acești autori ARN extras cu fenol din celulele mamiferelor conține în general trei componente principale, cu coeficienții de sedimentare de aproximativ 4 *S*, 18 *S* și 34 *S*.

În sfîrșit, se pune întrebarea prin ce mecanism acționează fenolul pentru a extrage acizii ribonucleici? După Kirby (1957) unul din iniția-

torii acestei metode, fenolul ar provoca în primul rînd ruperea legăturilor de hidrogen existente între acidul nucleic și proteină, pe care o denaturează și o solubilizează. Proteinele denaturate în prima fază sînt dizolvate apoi de fenol iar în același timp se eliberează ARN. Această explicație concordă bine cu faptele observate curent în timpul extracției, cînd la prima tratare cu fenol proteinele denaturate formează un strat gros la interfața dintre fenol și apă. După al doilea tratament cu fenol, stratul proteic se subțiază vizibil, pentru ca, după al treilea tratament, proteinele să persiste sub forma unui strat extrem de subțire, iar în unele cazuri, cînd cantitatea inițială de proteină este mică, să dispară complet. În ultimul timp, majoritatea metodelor preconizate de diferiți cercetători pentru extracția ARN întrebuințează simultan atît fenolul cît și dodecil-sulfatul. Produsele finale astfel obținute prezintă o activitatea biologică mai accentuată și sînt totodată mai pure. O metodă tipică care utilizează fenolul și detergentul este cea preconizată de Pons (1964), metodă pe care o descriem în anexă.

Conținutul în proteină al soluțiilor de ARN. Trebuie precizat că în general determinarea proteinelor din soluțiile de ARN întîmpină unele dificultăți datorită : *a*) concentrației în general scăzute a proteinelor în extractele de acizii nucleici (sub 1%) ; *b*) sensibilității relativ reduse a majorității metodelor de determinare a proteinelor.

La fel ca și dozarea acizilor nucleici, dozarea proteinei trebuie efectuată prin două metode ; numai în acest caz se poate controla exactitatea determinării. Metoda turbidimetrică, de exemplu, este extrem de expeditivă dar ea poate da valori diferite atunci cînd se lucrează cu proteine diferite. Un dezavantaj similar îl prezintă și metoda biuretului și chiar metoda descrisă de Lowry și colab. (1951). În aceste cazuri dezvoltarea culorii variază în funcție de natura proteinei.

Deosebit de rapide și utile s-au dovedit a fi metodele fizice de determinare a proteinei conținute în soluțiile de ARN. Astfel, metoda polarografică poate detecta o contaminare de 0,3% proteină într-o soluție care conține 40 μg de ARN (Blazsek și Bukaresti, 1962). Din păcate, metoda spectrofotometrică cunoscută pentru sensibilitatea ei remarcabilă, în cazul variatelor și multiplelor determinări, este în cazul proteinei de aproximativ 10 pînă la 15 ori mai puțin sensibilă decît metoda lui Lowry și colab. (1951). Cromatografia pe hîrtie este utilizată atît pentru detectarea proteinei cît și a polipeptidelor sau acizilor aminați din soluția de ARN.

Dintre metodele discutate, majoritatea cercetătorilor întrebuințează metoda descrisă de Lowry și colab. (1951) pentru dozarea proteinei din extractele de ARN. Principalele ei avantaje sînt : *a*) sensibilitatea de 100 ori mai mare decît a metodei biuretului ; *b*) specificitatea accentuată deoarece relativ puține substanțe dau o reacție de culoare în condiții asemănătoare (dintre acestea amintim aminoacizii, triptofanul, tirozina, cei mai mulți

Scanned with OKEN Scanner

fenoli, acidul uric, guanina şi xantina). Întrucît majoritatea preparatelor de acizi nucleici conţin acizi aminaţi, la aplicarea acestei metode trebuie să se ţină seama de acest fapt.

Fracţionarea acizilor ribonucleici pe coloană cromatografică

În ultimii ani, s-au obţinut rezultate remarcabile de separare şi caracterizare a diferiţilor ARN cu ajutorul schimbătorilor de anioni. Cromatografia pe coloană poate înlocui centrifugarea în gradient de densitate a acizilor nucleici. Unii autori sugerează chiar posibilitatea cunoaşterii cu ajutorul coloanei cromatografice a compoziţiei în baze a acizilor ribonucleici (Sueoka şi Cheng, 1962). Dintre cele mai importante realizări obţinute cu ajutorul cromatografiei pe coloană pot fi amintite cele de fracţionare şi caracterizare a ARN-*M* şi a ARN bicatenar. Este interesant de semnalat că nici una din metodele întrebuinţate pînă acum în acest scop nu a dat rezultate atît de bune.

Majoritatea cercetătorilor admit astăzi că fracţionarea acizilor nucleici pe coloană se datoreşte mai multor factori şi anume : *a*) lungimii diferite a lanţurilor de ARN (efectul de mărime sau de structură primară) ; *b*) structurii secundare şi terţiare a moleculelor (efectul punţilor de hidrogen şi a orientării moleculei) ; *c*) compoziţiei diferite în baze (efectul bazelor).

Dintre schimbătorii de anioni, cei mai utilizaţi pentru fracţionarea ARN sînt albumina metilată, Ecteola şi DEAE-celuloza. Menţionăm că ultimii doi sînt în special întrebuinţaţi pentru fracţionarea ARN-*S*, în timp ce albumina metilată este recomandată pentru moleculele de ARN înalt polimerizate.

FRACŢIONAREA ARN-S

Miura şi Suzuki (1956) au fracţionat ARN-*S* pe o coloană cu amidon „Cato 8" şi au obţinut unele fracţiuni de ARN-*S* cu activitate specifică faţă de leucină şi tirozină. Burness şi Vitoso (1961) izolează tot două fracţiuni din ARN-*S* cu ajutorul unei coloane încărcate cu gel de fosfat de calciu.

Fracţionarea avansată a ARN-*S* a fost obţinută de Cantoni (1962), pe o coloană de „Brushită", de pe care eluţia cu tampom fosfat la pH 6,8 l-a condus la separarea a 7 fracţiuni ; dintre acestea una a fost specifică faţă de prolină, iar alta faţă de tirozină şi valină.

Hartman şi Coy (1961) întrebuinţează o coloană de hidroxiapatită, echilibrată cu fosfat de potasiu 0,005 M la pH 6,8 şi fracţionează astfel

ARN-*S* extras din *E. coli* în două fracțiuni, care au fost specifice pentru valină sau fenilalanină. Everett și colab. (1960) au pus la punct o tehnică specială cromatografică pentru fracționarea ARN-*S* pe coloană de silice. Ei amestecă ARN-*S* cu un solvent organic, iar apoi eluția o realizează cu un amestec de solvenți organici. Se obțin astfel cinci fracțiuni de ARN-*S* specifice pentru tirozină, triptofan, histidină, valină și alanină.

Celuloza parțial acetilată condensată cu acidul *para*-aminobenzoic diazotat și cuplat cu guanina i-a servit lui Jones și Parson (1961) pentru fracționarea ARN-*S*. Eluția de pe coloană s-a realizat cu NaCl 0,5 M, 0,2 M și 0,1 M, obținîndu-se trei fracțiuni cu compoziții în baze azotate, diferite.

Aubel-Sadron și colab. (1961) au transformat ARN-*S* din drojdie în sarea sa cuaternară de amoniu, fapt ce ia conferit proprietatea de a fi solubil în unii solvenți organici. Fracționarea acestui nou compus a fost apoi realizată pe o coloană de silice căreia i s-a aplicat un gradient de NaCl. S-au obținut mai multe fracțiuni, a căror specificitate față de acizii aminați nu a fost însă testată.

Goldthwait (1959) separă în două fracțiuni ARN-*S* din ficatul de șobolan cu ajutorul unei coloane de Ecteola-celuloză, dintre care una se eluează cu un gradient de NaCl și reprezintă un ARN-*S* tipic, iar a doua fracțiune nespecifică se eluează cu hidroxid de amoniu. Tot cu ajutorul Ecteolei, Goldthwait și Starr (1960) au separat ARN-*S* extras din drojdie. Este interesant de remarcat în legătură cu aceste rezultate că Klee și Staehelin (1962) au reușit să elueze de pe coloană ARN-*S* din drojdie numai cu ajutorul gradientului de NaCl și în prezența EDTA 0,001 M. Aproape toată cantitatea de ARN-*S* se eluează în aceste condiții experimentale sub forma unei singure componente.

Efectul temperaturii asupra comportării cromatografice a ARN-*S* a fost studiat de Goldthwait și Kerr (1962). Cu această ocazie, ei au arătat că temperatura ridicată determină ca ARN-*S* să fie reținut mai puternic pe Ecteola-celuloză. Astfel, dacă la 23°C marea majoritate a ARN-*S* se eluează cu un gradient de NaCl, încălzirea lui la 60 și 80°C face ca majoritatea ARN-*S* să se elueze numai cu NaCl 1 M. Întrucît temperatura acționează în primul rînd asupra structurii secundare a acizilor nucleici, s-a ajuns la concluzia că afinitatea mai crescută a ARN-*S* încălzit față de Ecteola se datorește în special modificării structurii sale secundare. Argumente suplimentare în favoarea acestui fapt au fost obținute prin compararea proprietăților cromatografice ale ARN-*S* cu cele ale ARN-ribozomal, de aceeași greutate moleculară. S-a observat astfel că în timp ce ARN-*S* poate fi eluat de pe Ecteola cu un gradient de NaCl, ARN ribozomal se eluează numai cu un gradient de glicină. Totodată, s-a observat că încălzirea determină modificarea proprietăților cromatografice a celor doi ARN făcîndu-i să se asemene între ei. Astfel, în timp ce afinitatea față de Ecteola a ARN-*S* încălzit crește, afinitatea ARN-ribozomal supus aceluiași tratament descrește, apropiindu-se astfel de aceea pe care

o are ARN-*S* încălzit. Acest fapt demonstrează că structura celor doi ARN supuşi încălzirii se aseamănă mai mult decît înainte de tratarea lor termică.

Comportarea diferită a celor două tipuri de ARN poate fi explicată prin structura secundară mai rigidă pe care o are ARN-*S* (vezi structura secundară a ARN-*S*) la temperatura camerei şi la o forţă ionică scăzută faţă de aceea a ARN-ribozomal (de aceeaşi greutate moleculară). Datorită structurii moleculare diferite, ARN-*S* are mai puţine grupe fosforice disponibile pentru a forma legături cu grupările aminice ale Ecteola-celulozei. Pentru acest motiv tăria legăturilor sale cu acest adsorbant este mai slabă decît ale moleculelor de ARN-ribozomal cu aceeaşi mărime. Ca o consecinţă a acestui fapt, primul poate fi relativ mai uşor eluat de pe coloană decît al doilea. Sub efectul temperaturii, moleculele de ARN-*S* devin mai flexibile, ceea ce le măreşte afinitatea pentru Ecteola-celuloză. Favorizarea eluţiei ARN-*S* de pe coloană în prezenţa unei anumite cantităţi de EDTA este atribuită influenţei pe care o are această substanţă asupra structurii secundare a acidului nucleic.

DEAE-celuloza a fost întrebuinţată recent pentru izolarea ARN-*S* şi de Osawa (1960), Monier şi Grunberg-Manago (1962) (fig. 113). După

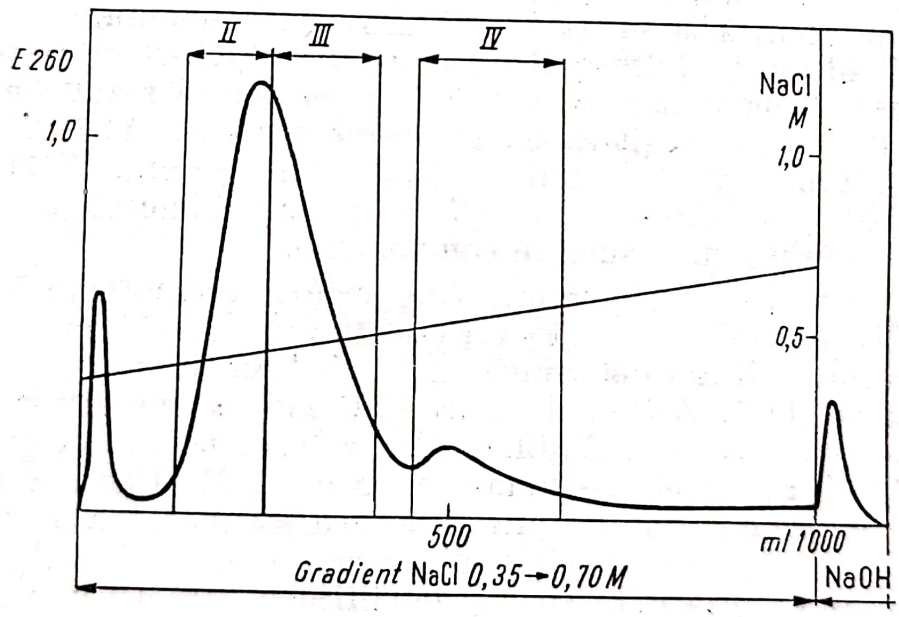


Fig. 113. — Cromatografia pe coloană de DEAE-celuloză a ARN-*S* din drojdie. Fracţiunea a II-a are capacitatea de acceptare a valinei superioară fracţiunii a III-a (după Monier şi Grunberg-Manago,1962).

Staehelin (1963) acest schimbător de anioni nu este cu nimic mai puţin avantajos decît Ecteola pentru fracţionarea acizilor ribonucleici. După Otaka şi colab. (1962), DEAE-celuloza cu o capacitate adsorbantă joasă (0,4 meg/gm) este mult mai indicată pentru separarea ARN-*S* şi chiar a ADN decît DEAE-celuloza cu o capacitate adsorbantă ridicată.

Scanned with OKEN Scanner

ARN-*S* poate fi cromatografiat și pe albumină metilată. Eluția lui se realizează în momentul în care concentrația NaCl este de aproximativ 0,6 M. (Popa și colab., 1966 *a*, *b*).

FRACȚIONAREA MOLECULELOR ÎNALT POLIMERIZATE

Întrebuințarea derivaților celulozei ca schimbători de ioni. Acidul ribonucleic infectant extras din VMT a fost supus cromatografiei pe coloană de DEAE-celuloză de către Cochran și Childester (1957). Acești autori au observat însă că materialul infectant, sensibil la acțiunea RN-azei, nu se adsoarbe pe acest anionit. În schimb, Lippincott (1960) fracționează același ARN pe Ecteola-celuloză și obține două fracțiuni : prima, care cuprinde cea mai mare parte a ARN, se eluează între 0,001 și 0,03 M NaCl, iar a doua, care posedă activitatea infectantă maximă, între 0,05 și 0,07 M NaCl. Este interesant de menționat cu această ocazie că după Commoner și colab. (1956) virusul mozaicului tutunului se eluează de pe coloana de Ecteola-celuloză la aceeași molaritate de NaCl la care se eluează și fracțiunea de ARN cu activitate infectantă ridicată. Deoarece însă autorii citați au constatat că RN-aza nu a inactivat complet ARN izolat prin cromatografie, nu este sigur dacă infectivitatea fracțiunii a doua s-a datorat ARN extras din VMT sau unor particule de virus nedegradate, care au impurificat produsul.

Din cercetările noastre asupra ARN extras din virusul gripal purificat rezultă că și în acest caz eluția de pe DEAE-celuloză a acestui compus se produce la molarități scăzute de NaCl (Portocală și colab., 1964 *a*).

În același timp menționăm că numeroși autori au demonstrat că o parte din ARN-ribozomal, înalt polimerizat, are o slabă afinitate pentru adsorbanții celulozici (Boch și colab., 1960 și 1961 ; Bloemendal și colab., 1960 ; Creaser și Spencer, 1960 ; Rafaelson, 1960 ; Goldthwait și Starr, 1960 ; Goldthwait și Kerr, 1962 ; Popa, 1964 ; Portocală și colab., 1964 *c* ; Popa și Portocală, 1964 etc.). Este important de subliniat faptul că în condițiile experimentale în care aceste molecule trec prin coloană sau sînt slab reținute, moleculele cu greutate amoleculară mică sînt în mod obișnuit reținute de același adsorbant.

Figura 114 reprezintă curba de eluție tipică a ARN-ribozomal înalt polimerizat, extras cu fenol din *E. coli* și cromatografiat pe o coloană de Ecteola-celuloză. Se observă că aproximativ 44% din adsorbanța produsului este regăsită la începutul eluției, în fracțiunea „filtrată" de coloană, 10% în fracțiunea eluată cu un gradient neutru de NaCl, iar 46% în fracțiunea eluată cu un gradient de pH. Goldthwait și Kerr (1962)

au observat că adsorbţia pe coloană de Ecteola-celuloză a ARN-ribozomal este variabilă în funcţie de dimensiunile coloanelor utilizate. Dacă se întrebuinţează coloane mici, peste 80% din ARN introdus pe coloană se regăseşte în fracţiunea filtrată la începutul eluţiei. În schimb, coloanele mari se comportă invers, deoarece procentul de ARN din fracţiunea fil-

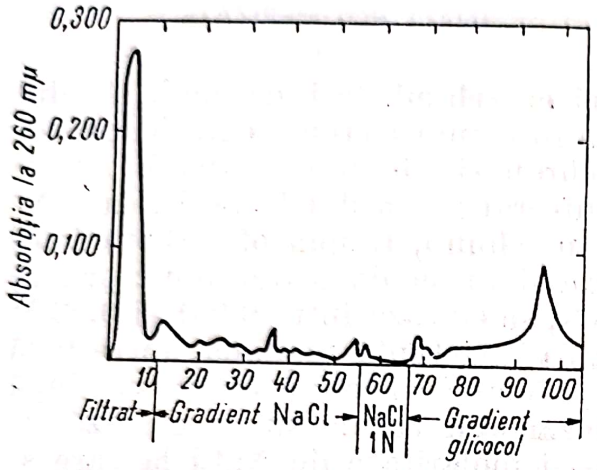


Fig. 114. — Curba de eluţie a 1,25 mg de ARN ribozomal înalt polimerizat extras cu fenol din *E. coli*, fracţionat pe Ecteola-celuloză (după Goldthwait şi Kerr, 1962).

trată scade la valori cuprinse între 8% şi 56%. ARN rămas pe aceste coloane poate fi eluat parţial cu un gradient neutru de NaCl (între 5 şi 20%) şi total cu NaCl 1 M care conţine 0,1 M NH_4OH (între 39 şi 83%).

În cercetările noastre de fracţionare a unor ARN de diferite origini, am întrebuinţat întotdeauna coloane mici de DEAE-celuloză (5×1,5), al căror randament de fracţionare a fost de aproximativ 80%, asemănător cu acela dat de coloanele de albumină metilată (Portocală şi colab., 1964 *b*; Popa, 1964; Popa şi Portocală, 1964; Portocală şi colab., 1965). Întrebuinţarea coloanelor mari de DEAE-celuloză pentru fracţionarea ARN tisulari nu ne-a dat rezultate satisfăcătoare în cazul izolării moleculelor înalt polimerizate. Credem că aceasta se datoreşte fixării puternice a moleculelor mari pe adsorbant, eluţia lor putînd fi realizată numai cu alcali, în condiţii în care acidul nucleic suferă degradări. Din figura 115 rezultă că majoritatea ARN extras cu fenol din creierul de şoarece se eluează la molarităţi scăzute ale unui gradient de NaCl, demonstrînd prin aceasta o slabă afinitate pentru DEAE-celuloză. De asemenea şi ARN extras din membrana corioalantoidiană a oului de găină embrionat prezintă o slabă afinitate pentru DEAE-celuloză (fig. 116).

Precizăm însă că cercetările noastre au arătat că slaba afinitate faţă de DEAE-celuloză a unei părţi din moleculele de ARN înalt polimerizaţi se manifestă numai dacă ARN nu a fost precipitat cu alcool după extracţia sa.

Din rezultatele prezentate pînă acum reiese că unii ARN virali şi o parte din cei ribozomali înalt polimerizaţi, de diferite origini, au uneori

o slabă afinitate pentru adsorbanţii celulozici introduşi în coloane mici cromatografice. Această particularitate se manifestă fie prin incapacitatea de a fi adsorbiţi, filtrînd prin coloană, fie, în cazul cînd sînt slab reţinuţi, prin eluare la molarităţi scăzute de NaCl.

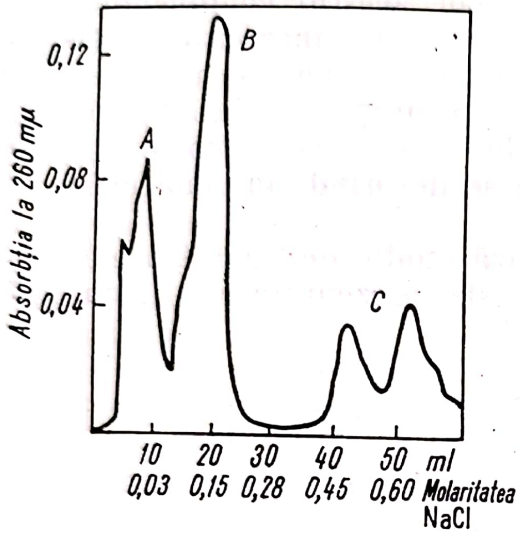


Fig. 115. — Curba de eluţie a 0,45 mg de ARN extras cu fenol din creierul de şoarece, fracţionat pe DEAE-celuloză (după Popa, 1964).

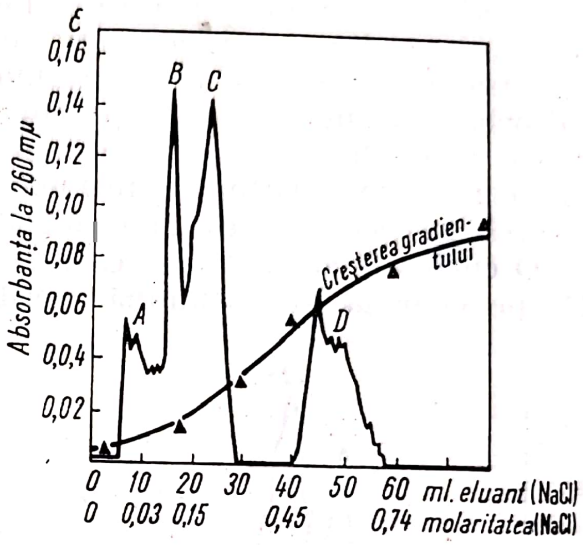


Fig. 116. — Curba de eluţie a ARN extras cu fenol din membrana corioalantoidă a embrionului de găină, fracţionat pe DEAE-celuloză (după Portocală şi colab., 1964 *a*).

Dintre factorii care influenţează cel mai mult comportarea cromatografică a unui ARN înalt polimerizat pe adsorbanţii celulozici, amintim:

a) procedeul de extracţie;

b) structura primară şi secundară a moleculei de ARN;

c) dimensiunile coloanelor, caracteristicile adsorbantului (capacitatea lui) etc.

Trebuie menţionat însă faptul că moleculele de ARN înalt polimerizate şi chiar acelea cu greutate moleculară mică au în majoritatea cazurilor o tendinţă evidentă de a se fixa puternic pe anioniţii celulozici amintiţi. De multe ori, eluţia lor nu se poate face în condiţiile în care structura moleculei de ARN să nu fie afectată. Din această cauză substituenţii celulozici, Ecteola şi DEAE-celuloza, nu sînt recomandabili pentru fracţionarea moleculelor înalt polimerizate de ARN. Întrebuinţarea acestor schimbători se restrînge astfel, în special la fracţionarea ARN-*S* şi la anumite tipuri de ARN înalt polimerizat. Cu toate neajunsurile pe care le au adsorbanţii celulozici, ei sînt totuşi capabili — în anumite condiţii experimentale — să ne ofere informaţii asupra structurii moleculelor de ARN. Astfel, rezultatele fracţionării unui ARN tisular, supus acţiunii razelor ultraviolete, ne-a arătat că DEAE-celuloza poate decela

modificări ale structurii secundare a moleculelor astfel tratate pe care albumina metilată nu le sesizează (vezi pag. 99).

Întrebuinţarea albuminei metilate. Marele avantaj al albuminei metilate, faţă de ceilalţi anioniţi întrebuinţaţi la fracţionarea ARN, constă în proprietatea sa de separare a moleculelor acestui compus dintr-un amestec, în ordinea greutăţii lor moleculare*. La începutul eluţiei se găsesc fragmentele moleculare sau moleculele care nu au putut fi reţinute de adsorbant. Pe măsură ce creşte concentraţia soluţiei de NaCl tamponată ce trece prin coloană, se eluează moleculele cu o greutate moleculară din ce în ce mai mare astfel că ultimele care se desprind sînt moleculele cu greutatea moleculară cea mai ridicată.

O curbă de eluţie tipică care ilustrează modul de fracţoinare a unui ARN pe coloana de albumină metilată este prezentată în figura 117.

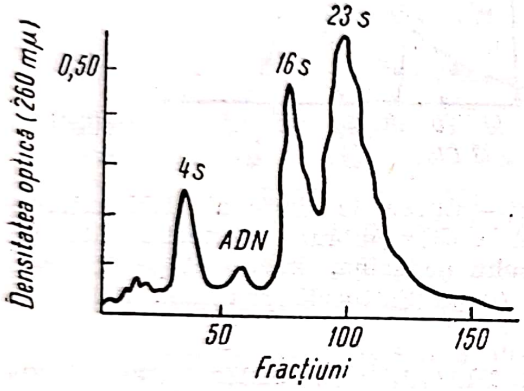


Fig. 117. — Fracţionarea pe coloană de albumină metilată a ARN total, extras din *E. coli*. Eluţia cromatografică a fost făcută cu un gradient de concentraţie liniar între 0,3 şi 0,7 M NaCl. Soluţia de NaCl tamponată cu Tris 0,025 M—HCl, pH 7 (după Monier şi colab., 1962).

Lerman (1955) a fost primul care a întrebuinţat albumina metilată adsorbită pe Kieselgur pentru fracţionarea moleculelor de ARN. Doi ani mai tîrziu, Brown şi colab. (1957) utilizează acelaşi adsorbant la separarea ARN extras din celulele tumorii Ehrlich.

Mandell şi Hershly (1960) au însă meritul de a fi perfecţionat această metodă în forma ei actuală. Aceşti autori au fost primii care au arătat posibilitatea separării în funcţie de greutatea lor moleculară atît a ARN cît şi a ADN în coloane cu albumină metilată.

Utilizînd aceeaşi metodă, Cocito şi colab. (1961 şi 1962) au reuşit să separe diferite fracţiuni de ARN din celulele HeLa.

Sueoka şi Cheng (1962) recomandă sistemul de eluţie discontinuă pentru separarea fracţiunilor de ARN. După aceşti autori, ARN-*S* se eluează între 0,2 şi 0,6 M NaCl, cu maximul de eluţie situat la 0,4 M NaCl, în timp ce ARN-ribozomal se eluează între 0,7 şi 1 M NaCl. Componenta

* Ca un dezavantaj al coloanelor de albumină metilată poate fi considerat faptul că acestea au o capacitate redusă de absorbţie, în comparaţie cu celulozele substituite. Din această cauză, atunci cînd se depăşeşte capacitatea coloanei, excesul de molecule de ARN care nu se fixează vor trece la începutul eluţiei.

Scanned with OKEN Scanner

cu greutatea moleculară de 16 *S* a ARN ribozomal are maximul de eluție la 0,8 M NaCl, iar componenta de 23 *S* la 0,85 M NaCl.

Gradientul de concentrație liniar pare a fi totuși mai potrivit pentru separarea fracțiunilor de ARN de pe coloană. Prin acest sistem Monier și colab. (1962), Ishihama și colab. (1962) obțin o delimitare netă a diferitelor componente de ARN (fig. 116). De reținut faptul că și în acest caz cele trei componente ale ARN extras din *E. coli* s-au eluat la aproximativ aceeași molaritate de NaCl ca în sistemul discontinuu, și anume ARN-*S* la 0,4, ARN cu coeficient de sedimentare 16 *S* la 0,75, iar ARN de 23 *S* la 0,85 M NaCl (Ishihama și colab., 1962).

Scurt timp după introducerea albuminei metilate în tehnica de fracționare cromatografică a acizilor nucleici, ea a fost întrebuințată și la izolarea fracțiunii infectate dintr-un amestec de molecule de ARN, extras din celule inoculate cu diferite virusuri (Cocito și colab., 1961; Kubinski și Koch, 1962; Kubinski și colab., 1962; Portocală și colab., 1964*b*; Ralph și colab., 1965 etc).

Astfel, Kubinski și colab. (1962) demonstrează că fracțiunea infectantă a ARN extras cu fenol din celulele amniotice infectate cu virusul poliomielitic se găsește în eluatul rezultat după separarea tuturor celorlalte fracțiuni de ARN (fig. 118). Din figura 118 se mai observă că fracțiunea infectantă se eluează în jurul gradientului de concentrație de NaCl de 0,825 M.

Într-o lucrare recentă, Portocală și colab. (1964*b*) au întrebuințat albumina metilată concomitent cu DEAE-celuloza, pentru izolarea fracțiunii infectante de ARN, extras din creierul de șoarece inoculat cu virusul encefalomiocarditei murine (MM). Inocularea intracerebrală la șoarece a probelor recoltate în timpul eluției au dovedit că întreaga infectivitate este concentrată într-o singură fracțiune. Aceasta se eluează în cazul albuminei metilate în jurul gradientului de concentrație creat de NaCl 0,81 M, iar de pe DEAE-celuloză la aproximativ 0,15 M NaCl (fig. 119).

Media mortalității șoarecilor în urma inoculării fracțiunii infecante eluate de la albumina metilată a fost de 46%, iar în cazul DEAE-celulozei de 53%. Pasajele ulterioare au dat însă o mortalitate de 100%, similară cu aceea determinată de virusul MM. Perioada de incubație a bolii provocată de fracțiunea infectantă a fost prelungită față de aceea a ARN proaspăt extras, adică de cinci zile în loc de două. După primul pasaj al virusului indus de fracțiunea infectantă, perioada de incubație se scurtează în limitele celei ce caracterizează virusul inițial.

Este posibil ca prelungirea perioadei de incubație și diminuarea infectivității ARN cromatografiat să fie datorite diluției produsului activ în eluat, ca și modificărilor suferite de moleculele de ARN în timpul cromatografiei. Astfel, trebuie să precizăm că în tehnica utilizată de noi probele au fost recoltate după trecerea lor prin spectrofotometru fixat la 260 mμ, lungime de undă la care acizii nucleici sînt inactivați după

un anumit interval de timp. Faptul că infectivitatea produsului inoculat este scăzută cu aproximativ 50% faţă de cea iniţială ne-a făcut să conchidem că influenţa factorilor enumeraţi mai sus este totuşi redusă.

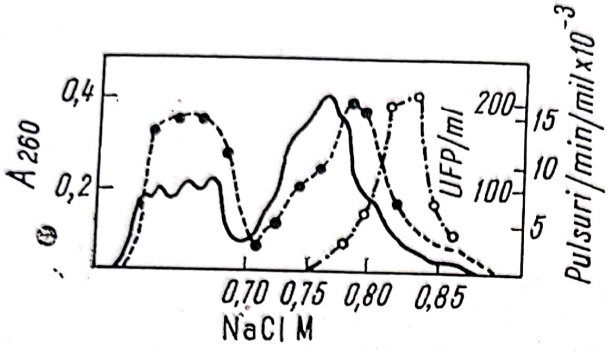


Fig. 118. — Separarea cromatografică, cu ajutorul albuminei metilate, a ARN extras din celulele amniotice infectate cu virusul poliomielitic de tip I, tulpina Mahoney. Absorbanţa (———), radioactivitatea (.—.—.—) şi infectivitatea (o— — —o— — —o). UFP = unităţi formatoare de plaje (după Kubinski şi colab., 1962).

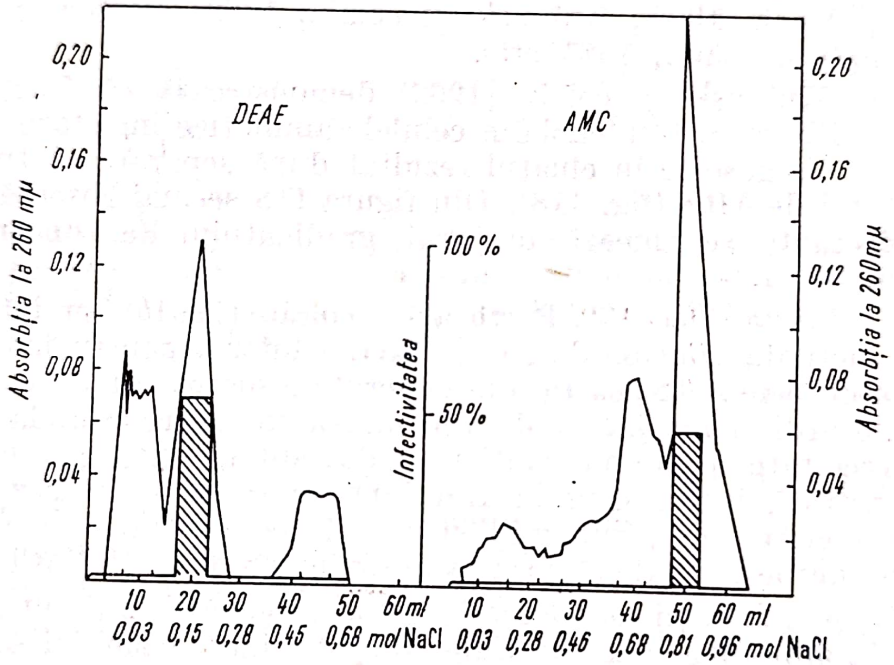


Fig. 119. — Fracţionarea pe coloană de DEAE-celuloză şi pe albumină metilată adsorbită pe celită (AMC) a ARN extras cu fenol din creierul de şoarece inoculat cu virusul encefalomiocarditei murine. Zonele haşurate reprezintă fracţiunea infectantă (după Portocală şi colab., 1964).

Acelaşi acid nucleic infectant extras însă cu fenol, dodecil-sulfat şi bentonită, concentrat prin precipitare cu alcool, a prezentat o infectivitate a fracţiunii eluate de pe AMC identică cu aceea a preparatului necromatografiat (Portocală şi colab., 1966).

Cercetări asupra ARN-mesager. Primele cercetări care au avut ca scop analizarea greutăţii moleculare a ARN-mesager extras cu fenol au

demonstrat că acest produs are coeficientul de sedimentare cuprins între 8 şi 10 *S* (Nomura şi colab., 1960; Gros şi colab., 1961).

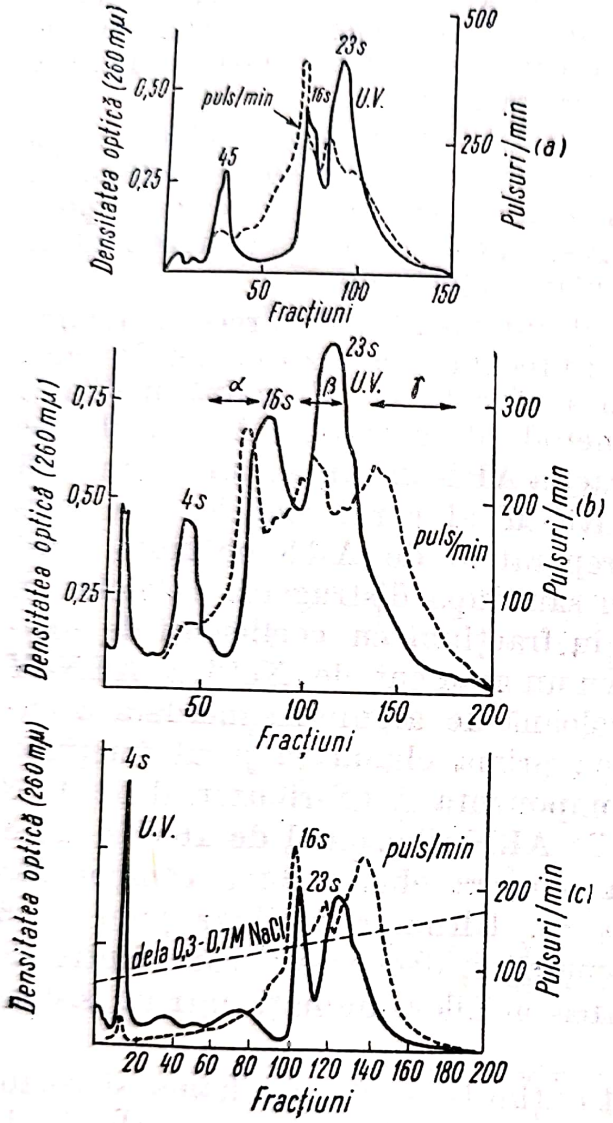
Greutatea moleculară dedusă din aceste valori era însă neaşteptat de mică faţă de aceea rezultată din calculul teoretic. Într-adevăr, lungimea unui lanţ polinucleotidic corespunzător acestor coeficienţi de sedimentare este prea mică pentru a-i permite codificarea secvenţei acizilor aminaţi din lanţul proteinelor cu greutate moleculară mare.

S-a presupus că ARN-*M* cu o greutate moleculară relativ mică este un produs de degradare care apare în cursul manoperelor de extracţie. În special mojararea celulelor cu alumină era bănuită a provoca depolimerizarea produsului sau de a determina extracţia selectivă a unor lanţuri speciale de ARN-*M*, cu greutate moleculară relativ mică.

Presupunerile acestea s-au dovedit întemeiate, deoarece Ishihama şi colab. (1962), Monier şi colab. (1962), precum şi alţi autori au dovedit, cu ajutorul cromatografiei pe coloană încărcată cu albumină metilată, că proprietăţile ARN-*M* depind de metoda de extracţie. Astfel, Monier şi colab. (1962) arată că în timp ce extracţia ARN în care se întrebuinţează alumină conduce la obţinerea unui ARN-*M* al cărui coeficient de sedimentare este de aproximativ 16 *S*, preparatele de ARN obţinute după liza celulară cu dodecil-sulfat de sodiu sau după distrugerea celulelor cu o presă dau un ARN-*M* mai bogat în fracţiuni cu coeficienţi de sedimentare mai ridicaţi (fig. 120). Eluţia cu un gradient de NaCl a ARN-*M* (marcat) extras din *E. coli* de pe o coloană de albumină metilată a pus în evidenţă patru fracţiuni principale: prima eluată în jurul fracţiunii 4 *S*, a doua între fracţiunea 4 *S* şi componenta ARN-ribozomal de 16 *S* (fracţiunea α), a treia între subunităţile ARN-ribozomal de 16 *S* şi 23 *S* (fracţiunea β) şi în sfîrşit fracţiunea a patra eluată după componenta ARN-ribozomal de 23 *S* (fracţiunea γ). Ultimele trei fracţiuni (α, β şi γ) reprezintă subfracţiuni de ARN-mesager, deoarece fiecare dintre ele este capabilă de a stimula încorporarea acizilor aminaţi într-un sistem acelular.

Rezultate asemănătoare au fost obţinute şi de Ishihama şi colab. (1962) prin analiza unui ARN-mesager nedegradat extras din celulele de *E. coli* normale şi după infectare cu fagul T_2. Cromatografia pe coloană de albumină metilată a demonstrat şi în acest caz că ARN-*M* este eterogen şi poate fi fracţionat tot în patru componente principale, cu următorii coeficienţi de sedimentare: (ARN-*M*-I) 8 *S*, (ARN-*M*-II) între 10 şi 12 *S*, (ARN-*M*-III) între 19 şi 21 *S* plus 13 *S* şi (ARN-*M*-IV) între 23 şi 30 *S* (fig. 121). Este interesant de menţionat faptul că cloramfenicolul inhibă sinteza ARN-*M*-IV fără să împiedice sinteza fracţiunilor ARN-*M*-II şi ARN-*M*-III. Totodată s-a putut demonstra că ARN-*M*-IV are proprietatea specifică de a se asocia *in vitro* de

ribozomii 70 *S*, proprietate de care fracţiunile ARN-*M*-II şi ARN-*M*-III sînt lipsite.



←*Fig. 120.* — Influenţa procedeului de extracţie asupra comportării cromatografice a ARN-*M* din *E. coli*, pe coloană de albumină metilată. *a*) ARN preparat prin mojararea celulelor cu alumină ; *b*) ARN obţinut după liza celulară cu dodecil-sulfat de sodiu ; *c*) ARN obţinut după distrugerea celulelor cu o presă (după Monier şi colab., 1962).

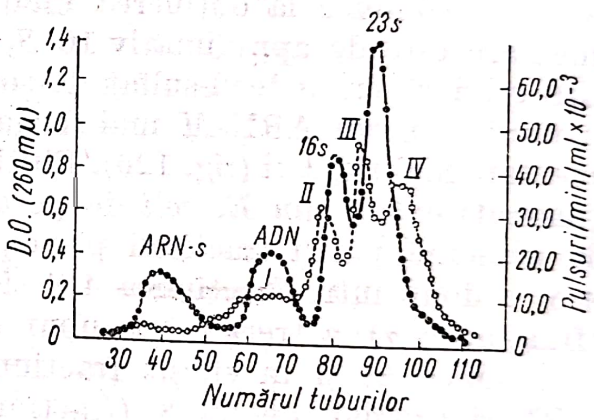


Fig. 121. — Fracţionarea acizilor nucleici marcaţi cu P^{32} din *E. coli*, pe coloană de albumină metilată.

I, ARN–M–I; II, ARN–m–II; III, ARN–m–III; IV, ARN –m–IV. Absorbţia în UV (– · – · –), radioactivitatea (–o–o–o) (după Ishihama şi colab., 1962).

Fracţionarea pe coloană de albumină metilată a ARN extras din culturi celulare de celule L infectate cu virusul encefalomiocarditei murine (MM) în prezenţa P^{32} ne-a condus la obţinerea a trei componente marcate izotopic. Prima componentă (*a*) s-a eluat la aproximativ 0,45 M NaCl, a doua (*b*) la 0,7 M NaCl şi ultima (*c*) la 0,8 M NaCl. După cum se observă din figura 122, toate maximele componentelor ARN marcate izotopic sînt deplasate în dreapta fracţiunilor corespunzătoare, evidenţiate spectrofotometric. Pe curba de eluţie cromatografică obţinută de noi localizarea fracţiunilor marcate izotopic este asemănătoare cu aceea

a fracțiunilor ARN-*M* din experiențele cercetătorilor citați mai sus. Menționăm că distrugerea celulelor a fost făcută la rece cu un omogenizator Potter.

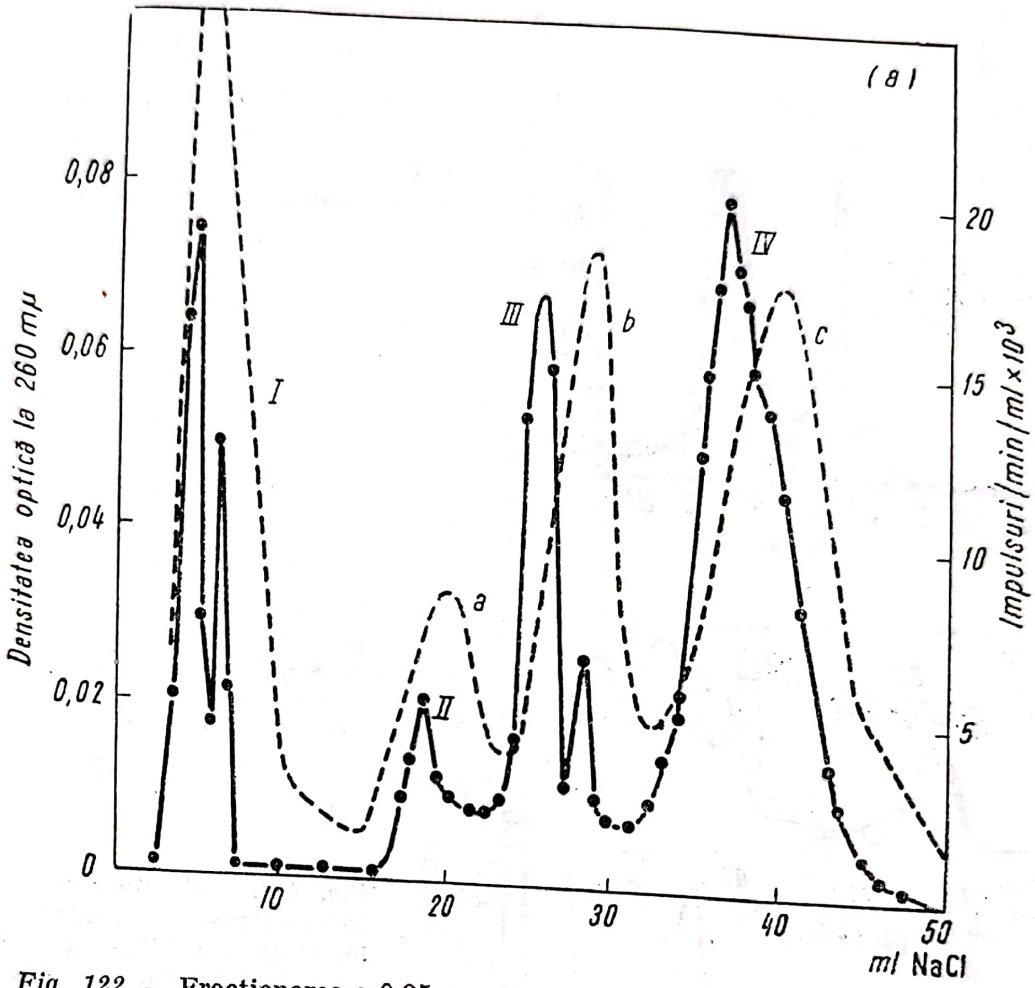


Fig. 122. — Fracționarea a 0,25 mg de ARN marcat cu P^{32}, extras din culturi celulare L, infectate cu virusul MM, pe coloană de albumină metilată adsorbită pe celită. Absorbția (— · — ·), radioactivitatea (— — — —). (după Popa și colab., 1965).

Cercetări asupra acidului ribonucleic bicatenar. Foarte recent, s-a descoperit că preparatele de acizi nucleici obținuți din unele celule infectate cu virusuri ARN conțin o fracțiune de ARN rezistentă la acțiunea RN-azei (Montagnier și Sanders, 1963; Nonoyama și Ikeda, 1964; Pons, 1964; Ralph și colab., 1965; Portocală și colab., 1965) (vezi capitolul al V-lea).

Această fracțiune a putut fi izolată cu ajutorul metodei ultracentrifugării prin sedimentare în gradient de densitate sau în condiții mai favorabile prin cromatografia pe coloană de albumină metilată. Molaritatea soluției de NaCl la care acest ARN dublu spiralat infectant se eluează este diferită de aceea la care se eluează ARN infectant monospiralat, al aceluiași virus. Pons (1964), ca și Maes și Wecker (1964), arată că există deci doi ARN infectanți ai virusului polio : primul care se eluează de pe albumina

metilată la 0,84 M NaCl şi este bicatenar, în timp ce al doilea, monospiralat, se eluează la 1,04 M NaCl (fig. 123). Cu ajutorul metodei cromato-

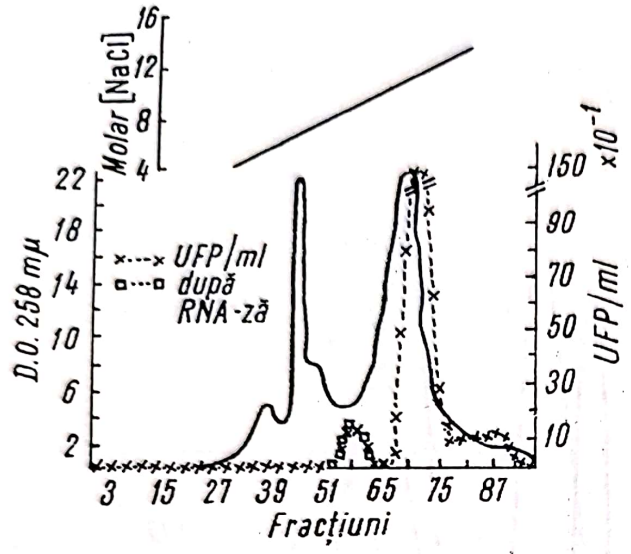


Fig. 123. —Eluţia în gradient de NaCl a ARN extras din celulele HeLa infectate cu virusul poliomielitic. Gradientul s-a realizat între 0,4 şi 2,0 M NaCl. D.O. (———); infectivitatea (UFP/ml) înainte de tratamentul cu RN-ază (x...x..) şi după tratarea cu 0,1 μg de RN-ază timp de 20 min, la temperatura camerei (după Pons, 1964).

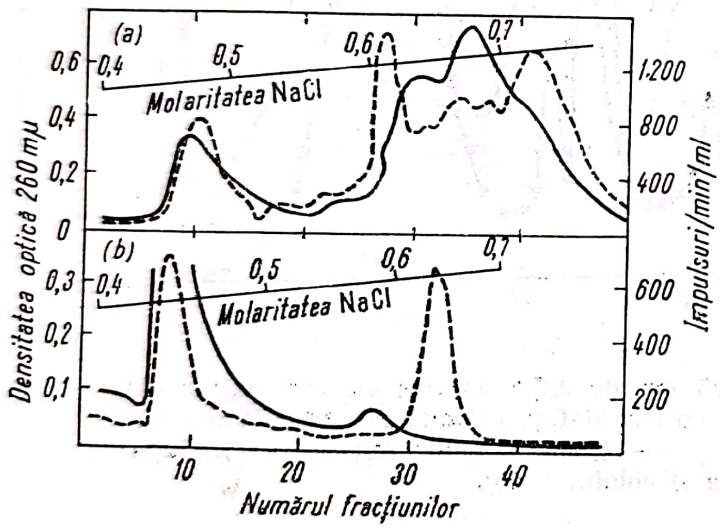


Fig. 124. — Fracţionarea acizilor nucleici extraşi din frunzele de tutun infectate cu VMT, pe coloană de albumină metilată. *a*) acizii nucleici nativi şi *b*) trataţi cu RN-ază. Absorbţia (———) şi radioactivitatea (– – – –) (după Ralph şi colab., 1965).

grafice pe coloană, Pons a demonstrat că sinteza ARN bicatenar are loc înaintea apariţiei cantităţii maxime de ARN monocatenar, viral, infectant.

Condiţiile experimentale de analiză şi natura ARN bicatenar, a cărui greutate moleculară poate fi specifică virusului care l-a iniţiat, determină probabil ca eluţia lui de pe albumina metilată să nu se facă întotdeauna la aceeaşi molaritate a gradientului de NaCl. Astfel, Ralph şi colab. (1965) au observat că fracţiunea de ARN bicatenar, rezistent la acţiunea RN-azei, prezentă în ARN extras din frunzele de tutun infectate cu VMT, se găseşte între 0,6 şi 0,7 M NaCl (fig. 124). Prin urmare, în acest ultim caz, fracţiunea se elueză mult mai repede decît ARN bicatenar descris de Pons (1964). Cercetările noastre, consacrate studiului multi-

Scanned with OKEN Scanner

plicării virusului MM în culturile de celule L, ne-au arătat că fracțiunea de ARN rezistentă la acțiunea RN-azei, care apare numai la 7 ore după

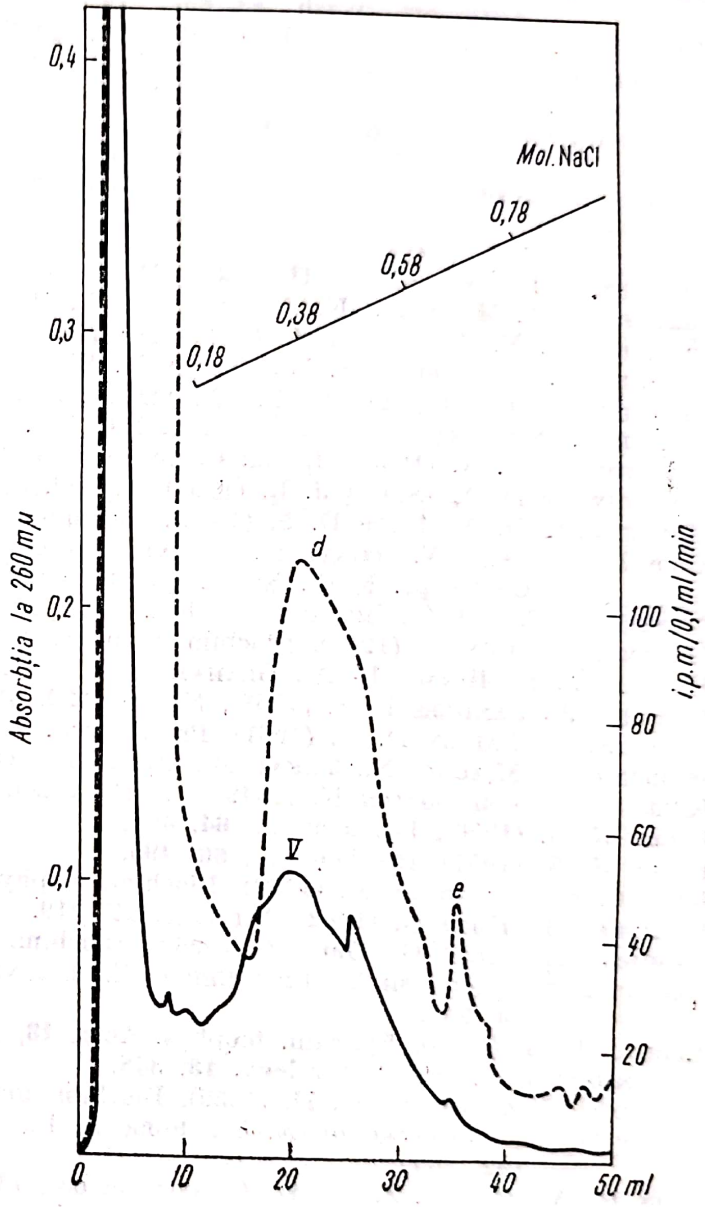


Fig. 125. — Fracționarea pe coloană de albumină metilată a ARN extras în celulele L infectate cu virusul MM. ARN extras după 7 ore de la infectare a fost tratat cu RN-ază (5 μg, 30 min, la temperatura camerei). Absorbția (———), radioactivitatea (— — — —) (după Portocală și colab., 1965).

infectarea celulelor, se elucează de pe coloana de albumină metilată cu NaCl 0,68 M (fig. 125).

Alexander H. E., Koch G., Mountain I. M., Van Damme O. (1958), J. exp. Med., **108**, 493.
Aubel-Sadron C., Beck G., Ebel J. (1961), Biochim. biophys. Acta, **53**, 11.
Blazsek V., Bukaresti L. (1962), Biochim. biophys. Acta, **61**, 970.
Bloemendal H., Boch L., Sluyser M. (1960), Biochim. biophys. Acta, **41**, 454.

Scanned with OKEN Scanner

Boch L., Bloemendal H., Sluyser M. (1960), Biochim. biophys. Acta, **41**, 444.
Boch L., Van Der Vende C., Bloemendal H. (1961), Nature, **191**, 349.
Brown R. A., Davies M. C., Colter J. S., Logan J. B., Kritchevsky (1957), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **43**, 857.
Burness A. T. H., Vitoso A. D. (1961), Biochim. biophys. Acta, **49**, 225.
Cantoni G. L. (1962), în *Acides ribonucléiques et polyphosphates*, C.N.R.S., Paris, p. 201.
Cochran G. W., Childester J. L. (1957), Virology, **4**, 390.
Cocito C., Prinze A., De Somer P. (1961), Nature, **191**, 573.
Cocito C., De Somer P. (1962), Experientia, **18**, 218.
Colter J. S., Brown L. (1956), Science, **124**, 1 077.
Commoner B., Lippincott J. A., Shearer G. B., Richman E. E., Wu J. (1956), Nature, **178**, 767.
Creaser E. H., Spencer E. H. (1960), Biochem. J., **76**, 171.
Crestfield A. M., Smith K. C., Allen F. W. (1955), J. biol. Chem., **216**, 185.
Davidson J. N., Waymouth C. (1944), Biochem. J., **38**, 375.
Everett G. A., Merril S. H., Holley R. W. (1960), J. amer. chem. Soc., **82**, 5 757.
Fraenkel-Conrat H., Singer B., Williams R. C. (1957), Biochim. biophys. Acta, **25**, 87.
Gierer A., Schramm G. (1956), Nature, **170**, 702.
Goldthwait D. A. (1959), J. biol Chem., **234**, 3 245.
Goldthwait D. A., Starr J. L. (1960), J. biol. Chem., **235**, 2 025.
Goldthwait D. A., Kerr D. S. (1962), Biochim. biophys. Acta, **61**, 930.
Gros F., Gilbert W., Hiatt H. H., Attardi G. F., Spahr P. E., Watson J. D. (1961), Cold. Spr. Harb. Symp. quant. Biol., **22**, 111.
Habermann V. (1959), Biochim. biophys. Acta, **32**, 297.
Hartman G., Coy U. (1961), Biochim. biophys. Acta, **47**, 612.
Harshaw J. P., Brown R. A., Graham A. F. (1962), Ann. Biochem., **4**, 182.
Huppert J., Sanders F. S. (1958), Nature, **182**, 515.
Jones A. S., Parson D. G. (1961), Proc. Chem. Soc., **61**, 78.
Ishihama A., Mizuno N., Takai M., Otaka E., Osawa S. (1962), J. mol. Biol., **3**, 251.
Kerr S. E., Seraidorian K. (1949), J. biol. Chem., **180**, 1 203.
Kirby K. S. (1956), Biochem. J., **64**, 405.
Kirby K. S. (1957), Biochem. J., **66**, 495.
Klee C. B., Staehelin M. (1962), Biochim. biophys. Acta, **61**, 668.
Kubinski H., Koch G. (1962), Virology, **17**, 219.
Kubinski H., Koch G., Dress O. (1962), Biochim. biophys. Acta, **61**, 332.
Laskov R., Margoliash E., Littauer U. Z., Eisenberg H. (1962), Biochim. biophys. Acta, **33**, 247.
Lerman L. S. (1955), Biochim. biophys. Acta, **18**, 132.
Lippincott J. A. (1960), Virology, **13**, 348.
Littauer U. Z., Eisenberg H. (1959), Biochim. biophys. Acta, **32**, 320.
Lowry O. M., Rosenbrough N. Y., Forr A. L., Rondall R. J. (1951), J. biol. Chem., **192**, 265.
Maes R., Wecker E. Z. (1964), Z. Naturforsch., **19**, 43.
Mandell J. D., Hershey A. D. (1960), Ann. Biochem., **1**, 66.
Miura K., Suzuki (1956), Biochim. biophys. Acta, **22**, 565.
Mónier R., Naono S., Hayes D., Hayes F., Gras F. (1962), J. mol. Biol., **3**, 311.
Monier R., Grunberg-Manago (1962), în *Acides ribonucléiques et polyphosphates*, C.N.R.S., Paris, p. 163.
Montagnier L., Sanders F. K. (1963), Nature, **199**, 664.
Nomura M., Hall B. D., Spiegelman S. (1960), J. mol. Biol., **2**, 306.
Nonoyama M., Ikeka J. (1964), J. mol. Biol., **9**, 763.
Osawa S. (1960), Biochim. biophys. Acta, **43**, 110.
Otaka E., Osawa S., Oata Y., Ihihama A., Mitsui H. (1962), Biochim. biophys. Acta, **55**, 310.
Pons M. (1964), Virology, **24**, 467.
Popa L. (1964), Disertaţie, Politehnica Timişoara.
Popa L., Portocală R. (1964), în *Probleme de biologie şi patologie moleculară*, Bucureşti, p. 146.

Scanned with OKEN Scanner

Popa L., Popescu M., Catz Z., Burducea O. (1965), Lucrare nepublicată.
Popa L., Cruceanu A., Portocală R. (1966 *a*), I-ul Simpozion de biofizică și biochimie, Sofia (sub tipar).
Popa L., Lăcătuș V., Cruceanu A. (1966 *b*), *A III-a conferință republicană de chimie*, Timișoara.
Portocală R., Boeru V., Samuel I. (1960), Voprosî Virusol., **5**, 178.
Portocală R., Popa L., Samuel I., Morfei A., Lăcătuș V. (1964 *a*), St. cerc. inframicrobiol., **15**, 225.
Portocală R., Samuel I., Popa L., Diculescu G. (1964 *b*), St. cerc. inframicrobiol., **15**, 515.
Portocală R., Popa L., Samuel I. (1965), Biochim. biophys. Acta, **95**, 185.
Portocală R., Popescu M., Lăcătuș V., Popa L. (1966), *I-ul Simpozion de biofizică și biochimie*, Sofia (sub tipar).
Portocală R., Popa L., Samuel I. Lăcătuș V., Morfei A. (1964 *c*), în *Probleme de biologie și patologie moleculară*, București, p. 127.
Portocală R., Popa L., Popescu M., Morfei A., Lăcătuș V., Catz Z., Burducea O. (1965), Rev. roum. inframicrobiol. (sub tipar).
Rafaelson M. F. (1960), Arch. Biochim. Biophys., **90**, 68.
Ralph R. K., Mattews R. E. F., Matus A. J., Mandel H. G. (1965), J. mol. Biol., **11**, 202.
Staehelin M. (1963), în *Progress in nucleic acid research*, sub red. J. N. Davidson, W. E. Cohn, Academic Press, New York, vol. II, p. 169.
Smith K. C., Cordes E., Schweet R. S. (1959), Biochim. Biophys. Acta, **33**, 286.
Sueoka N., Cheng T. Y. (1962), J. mol. Biol., **4**, 161.
Volkin E., Carter C. E. (1951), J. amer. chem. Soc., **73**, 1 516.
Weissman C., Borst P., Burdon R. H., Billeter M. A., Ochoa S. (1964), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **51**, 682.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 8

FIZIOLOGIE ŞI PATOLOGIE MOLECULARĂ

Rolul acizilor ribonucleici în sinteza proteinelor

Primele lucrări care au semnalat rolul ARN în sinteza proteinelor pot fi considerate cele ale lui Brachet (1941) şi Caspersson (1941). Folosind tehnici diferite pentru detectarea ARN intracelular, ei au observat că numai celulele care sintetizează cantităţi mari de proteine (celulele pancreasului endocrin, celulele care secretă pepsina din mucoasa gastrică etc.) sînt foarte bogate în ARN. Dimpotrivă, organele care au o puternică activitate fiziologică şi nu sintetizează proteine (inima, muşchii, rinichii) sînt sărace în ARN.

Dozările cantitative ale conţinutului diverselor organe şi ţesuturi în ARN, efectuate prin metode biochimice diferite, au confirmat presupunerea iniţială, conform căreia există o strînsă relaţie între conţinutul în ARN al celulelor şi capacitatea lor de a sintetiza proteine (Davidson, 1947 ; Leslie, 1955 etc.).

Folosirea radioizotopilor şi a autoradiografiei au dus la obţinerea de argumente noi în favoarea aceleiaşi ipoteze : celulele bogate în ARN încorporează aminoacizii marcaţi în proteinele lor mult mai intens şi rapid decît cele sărace în ARN (Ficq şi Brachet, 1956).

Pe de altă parte, Jeener şi Jeener (1952) au arătat că inhibiţia sintezei ADN la *Termobacterium acidophilus* nu duce la blocarea sintezei proteinelor ; în schimb abolirea sintezei ARN duce la încetarea sintezei proteice. Acelaşi lucru l-au observat şi Cohen şi Barner (1954) la *Escherichia coli*.

Rezultate analoge au obţinut, prin iradierea bacteriilor cu raze ultraviolete, Kelner (1953), Kanazir şi Errera (1954) : dozele slabe au inhibat sinteza ADN, pe cînd sinteza proteinelor a continuat mai departe, concomitent cu aceea a ARN.

Totodată s-a observat că sinteza moleculelor noi de ARN este necesară pentru ca sinteza indusă a unei enzime sau a unei proteine specifice să poată avea loc (Pardee, 1954 ; Spiegelman şi colab., 1955). Această

Scanned with OKEN Scanner

observație a fost confirmată de Chantrenne (1956), care a dovedit că sinteza unei proteine specifice cum este catalaza este asociată cu sinteza ARN nou sintetizat.

Jeener (1959) și Hamers și Hamers (1959) au arătat că încorporarea unor baze anormale — *2*-tiouracil, *6*-fluoro-uracil, azaguanina — în ARN determină sinteza proteinelor anormale. În acest fel s-a putut demonstra că schimbarea structurii ARN are drept consecință biosinteza unor proteine anormale, care s-au dovedit a fi și lipsite de specificitate.

Legătura dintre sinteza proteinelor și ARN a devenit deosebit de convingătoare prin descoperirea făcută de Fraenkel-Conrat (1956) și, independent de el, de Gierer și Schramm (1956). Ei au arătat pentru prima oară că infectivitatea virusului mozaicului tutunului (VMT) poate fi transmisă prin acidul său ribonucleic. S-a putut dovedi că ARN extras din VMT determină în timpul infecției sinteza proteinei specifice VMT. Aceste experiențe au fost confirmate și cu alți ARN virali. În acest fel s-a demonstrat intervenția directă a ARN în sinteza proteinelor virotice. Îndoielile manifestate la început de unii cercetători, privind puritatea ARN, s-au dovedit a fi neîntemeiate. Ulterior s-a arătat că și ARN extras dintr-un virus mai complex decît VMT poate determina infecția și sinteza proteinei virusului din care a fost extras (Portocală și colab., 1959 *c*).

Din aceste lucrări a rezultat un fapt de o deosebită importanță : ARN viral posedă întreaga informație „genetică" necesară pentru a induce singur sinteza specifică a particulelor complete de virus. Cercetări recente asupra mutațiilor induse chimic la VMT au adus noi argumente în favoarea rolului pe care îl are ARN în sinteza proteinelor.

Proteina de VMT conține 158 de acizi aminați a căror secvență exactă este azi bine cunoscută. Din această cauză, efectul unor substituții de baze din lanțul ARN de VMT asupra secvenței acizilor aminați ai proteinei virale a putut fi urmărit direct.

Într-adevăr, tratarea ARN din VMT cu HNO_2 a condus la substituția unor acizi aminați în lanțul proteinei virale (Wittmann, 1962).

Este interesant de menționat că din cele 16 substituții de acizi aminați descoperite pînă acum la mutanții VMT, obținuți în urma tratamentului ARN de VMT cu HNO_2, 11 au putut fi explicate prin substituția unor baze azotate din molecula acidului nucleic. Întrucît HNO_2 produce transformarea prin dezaminare a guaninei în xantină (G→X), a adeninei în guanină (A→G) și a citozinei în uracil (C→U), substituția observată a acidului aspartic cu alanina a fost atribuită modificării secvenței CUA a bazelor din macromolecula netratată, în CUG datorită tranziției (A→G) induse de HNO_2. De asemenea, leucina a fost substituită de către fenil-alanină datorită modificării secvenței CUU în UUU prin conversia C→U (Wittmann, 1961 ; Tsugita și Fraenkel-Conrat, 1962 ; Ochoa, 1963).

În sfîrșit, testarea activității unor polinucleotide sintetice și naturale în sistemele acelulare de sinteză a proteinelor, care au arătat posibilitatea

de a sintetiza proteine specifice în funcţie de ARN mesager adăugat, au adus cele mai noi dovezi după care sinteza proteinelor este controlată de ARN.

Acizii ribonucleici mesageri în celulele bacteriene. Există azi numeroase cercetări care dovedesc existenţa în celulele bacteriene a unui acid ribonucleic mesager (vezi pag. 185), care este deosebit de ARN ribozomal datorită compoziţiei sale în nucleotide (Volkin şi Astrahan, 1956), vitezei sale de „circuit" (Brenner şi colab., 1961) şi activităţii sale metabolice (Wood şi Berg, 1962).

Acest ARN, care se sintetizează în nucleu sub controlul direct al polimerazei ARN (Weiss şi Gladstone, 1959; Hurwitz şi colab., 1960), are compoziţia în baze similară cu aceea a ADN care îi serveşte ca tipar (Weiss şi Nakamoto, 1961) şi participă direct la sinteza proteinelor din citoplasmă (Tissières şi colab., 1960).

Faptul că sinteza proteinelor are loc cu ajutorul ribozomilor, iar aceştia sînt activi numai sub forma unor agregate (polizomi) care se constituie sub acţiunea directă a ARN-*M*, iar compoziţia în baze a ARN-*M* este similară cu a ARN din nucleu, demonstrează că acest acid nucleic participă direct la sinteza proteinelor şi că informaţia genetică pentru această sinteză se găseşte în nucleu.

Funcţia de mesager a polinucleotidelor sintetice. Nirenberg şi Matthaei (1961) au făcut o descoperire fundamentală privind rolul ARN în sinteza proteinelor. Ei au observat că într-un sistem acelular preparat din *E. coli* care constă în special din ribozomi, enzime de activare a acizilor aminaţi, ARN-*S* şi sursă de energie, dacă se introduce poli-U creşte încorporarea fenil-alaninei-C^{14}. În absenţa poli-U, încorporarea fenil-alaninei în proteină a fost foarte mică. Adaosul de 10 μg de poli-U la 1 ml amestec de reacţie a determinat creşterea de 1 000 de ori a încorporării fenil-alaninei. Proteina nou sintetizată a fost purificată cu HBr 33% în acid acetic glacial şi apoi precipitată cu apă. Analizele au arătat că această proteină are proprietăţile caracteristice ale unei polifenil-alanine autentice.

Un an mai tîrziu, Matthaei şi colab. (1962) au observat că activitatea mesageră a poli-U depinde de greutatea lui moleculară. Acizii poli-U cu greutate moleculară mare sînt mai activi decît cei cu greutate moleculară mică. Foarte activi s-au dovedit acizii poli-U cu greutatea moleculară cuprinsă între 50 000 şi 100 000.

Calculele stoechiometrice făcute au demonstrat că încorporarea fenil-alaninei este proporţională cu concentraţia poli-U. Cu această ocazie s-a stabilit că fiecare 1,5 mμmoli de acid uridilic din poli-U sînt necesari pentru a determina încorporarea a 10 mμ moli de fenil-alanină.

După Nirenberg şi colab. (1963) mecanismul sintezei polifenil-alaninei presupune existenţa a trei etape principale care depind de prezenţa enzimei

Scanned with OKEN Scanner

de activare a fenil-alaninei, poli-U, ribozomi, enzimă de transfer purificată, ATP, GTP şi un sistem generator de GTP :

$$\text{(1)}\quad \text{L-Fenil-alanină} + \text{ATP} \underset{\text{Enzima de activare a fenil-alaninei}}{\rightleftharpoons} \text{Fenil-alanina-AMP} + \text{PP}$$

$$\text{(2)}\quad \text{Fenil-alanina-AMP} + \text{ARN-}S \underset{\text{Enzima de activare a fenil-alaninei}}{\rightleftharpoons} \text{Fenil-alanina-ARN-}S + \text{AMP}$$

$$\text{(3)}\quad \text{Fenil-alanina-ARN-}S \xrightarrow{?} \xrightarrow{\text{poli-U, ribozomi, enzime de transfer, GTP}} \text{polifenil-alanina} + \text{ARN-}S$$

Descoperirea lui Nirenberg şi Matthaei prin care s-a demonstrat pentru prima dată posibilitatea de a obţine cu ajutorul unui polinucleotid sintetic o anumită proteină, a deschis o nouă perspectivă în faţa cercetătorilor, dîndu-se posibilitatea de a aborda direct problema rolului pe care îl au acizii nucleici în sinteza proteinelor şi de a descifra astfel codul după care se înlănţuie acizii aminaţi într-o proteină.

Într-adevăr, studiile care au urmat, efectuate în special de colectivul condus de Nirenberg, ca şi cele realizate de Ochoa şi colab. în care s-a urmărit influenţa unor polinucleotide mai complexe asupra încorporării diferiţilor acizi aminaţi, au permis să se stabilească experimental secvenţele cele mai probabile ale bazelor de care depinde codificarea acizilor aminaţi.

Funcţia de mesager a acizilor ribonucleici virali. Urmărind efectul ARN din VMT asupra unui sistem acelular de sinteză a proteinelor, Tsugita şi colab. (1962) au observat că încorporarea acizilor aminaţi marcaţi cu C^{14} în proteină este proporţională cu adaosul de acid nucleic viral. O parte din proteina marcată nou sintetizată a format un precipitat specific cu serul anti-VMT. De asemenea, o parte din proteina-C^{14} formată a putut fi purificată din amestecul de reacţie împreună cu proteina nemarcată de VMT prin precipitări izoelectrice repetate şi cromatografii pe coloană de DEAE-celuloză. Aceste prime analize au dovedit că produsul obţinut este o proteină tipică de VMT. Proteina-C^{14} sintetizată sub influenţa ARN de VMT a fost apoi tratată cu tripsină. Peptidele rezultate după digestia cu tripsină au fost izolate prin cromatografie pe coloană de Dowex-1. Ulterior, peptidele separate au fost analizate în ceea ce priveşte conţinutul lor în acizi aminaţi şi radioactivitate.

Rezultatele analizelor au demonstrat că fiecare peptid sintetizat este tipic pentru VMT. Singura deosebire a fost găsită doar la porţiunea terminală, N-acetil-serin-tirozina care există la proteina VMT şi lipseşte la proteina nou sintetizată.

Scanned with OKEN Scanner

Experienţe asemănătoare realizate *in vitro* cu ARN din fagul f_2 sau cu ARN din virusul icterului napului au adus noi dovezi în favoarea rolului de mesager pe care îl are ARN viral (Ofengand şi Haselkorn, 1962 ; Zinder, 1963). În acelaşi sens poate fi interpretată şi lucrarea lui Warner şi colab. (1963) care au dovedit că ARN din virusul poliomielitic introdus într-un sistem acelular de *E. coli* induce sinteza unei proteine identice anigenic cu capsomerele virusului poliomielitic.

Acizii ribonucleici mesageri în celulele animale. Numeroase dovezi atestă azi existenţa în bacterii a unei fracţiuni de ARN care este implicată specific în determinarea secvenţei acizilor aminaţi în timpul sintezei proteinelor.

Spre deosebire însă de bacterii, pînă în prezent se cunosc încă puţine informaţii despre existenţa ARN-*M* în celulele animale. De exemplu, Hiatt (1962) a pus în evidenţă în ficat o fracţiune de ARN nuclear care a fost marcat izotopic rapid, dar care a prezentat compoziţia în baze diferită de aceea a ADN.

Pe de altă parte, Barondes şi colab. (1962), cercetînd influenţa ARN nuclear, iar Maxwel (1962) pe aceea a ARN ribozomal din ficat asupra încorporării acizilor aminaţi *in vivo* de către un sistem preparat din *E. coli*, au observat că aceşti ARN induc sinteza unor proteine. Întrucît proteinele nou sintetizate n-au fost analizate, nu există dovezi evidente că acizii nucleici testaţi au avut o activitate mesageră tipică.

Cercetări preliminare, realizate de Arnstein şi colab. (1962), Weinstein şi Schechter (1962) au stabilit că un sistem acelular preparat din reticulocite de iepure determină sinteza polifenil-alaninei sub influenţa acidului poliuridilic. Studiile ulterioare efectuate asupra aceluiaşi sistem au precizat că maximul cantităţii de fenil-alanină (5 μmmoli/mg ribozomi), convertită în polipeptidă de către ribozomi, este apropiat de valoarea cea mai eficientă de încorporare (8 μmmoli/mg ribozomi) a unui sistem acelular de *E. coli* (Arnstein şi colab., 1964).

Din aceste rezultate s-a dedus că sistemele acelulare obţinute din celulele animale pot răspunde mesajului primit din partea unui polinucleotid sintetic atît cantitativ cît şi calitativ în acelaşi mod ca şi sistemele similare bacteriene.

S-a urmărit apoi influenţa ARN înalt polimerizat extras din reticulocite asupra încorporării acizilor aminaţi în proteine. Cu această ocazie s-a observat că acest ARN are o activitate de mesager şi pare a fi capabil de a induce sinteza hemoglobinei.

Fracţionarea ARN extras din reticulocite, prin centrifugarea în gradient de densitate, a dovedit că cel mai activ material a avut un coeficient de sedimentare mai mare decît 28 *S*. Considerînd că proprietăţile fizico-chimice ale acestui ARN sînt similare cu acelea ale ARN ribozomal, acest coeficient de sedimentare conduce la o greutate moleculară de $1{,}5 \times 10^6$.

Scanned with OKEN Scanner

Întrucît un acid aminat este codificat de o tripletă de nucleotide, pentru un lanţ proteic ca al globinei care conţine 150 de acizi aminaţi, sînt necesare 450 de nucleotide. Greutatea moleculară corespunzătoare a unui ARN-*M* ar trebui să fie de numai 135 000. Prin urmare, greutatea moleculară a ARN activ pentru sinteza hemoglobinei este de zece ori mai mare decît aceea dedusă în mod teoretic. După Arnstein şi colab. (1963), explicaţia posibilă pentru această discrepanţă ar putea fi că acest ARN controlează sinteza şi a altor proteine în afară de aceea a hemoglobinei sau că ARN-*M* este ataşat prin legături covalente de componenta ARN ribozomal cu constanta de sedimentare de 28 *S*.

Biosinteza ARN-M. Primele lucrări care au semnalat prezenţa în sistemele acelulare preparate din bacterii, plante sau mamifere a unui sistem enzimatic care determină sinteza ARN dependente de ADN au fost comunicate de Weiss şi Gladstone (1959), Hurwitz şi colab. (1960), Huang şi colab. (1960) etc. Aceste cercetări au precizat că sinteza ARN nu are loc în absenţa ADN. Ulterior s-a putut preciza că raportul bazelor în ARN nou sintetizat a fost identică cu raportul bazelor în ADN întrebuinţat ca primer (Weiss şi Nakamoto, 1961).

Toate aceste observaţii au demonstrat evident că ARN sintetizat de către polimeraza ARN izolată din sistemul enzimatic descris de autorii citaţi reprezintă copia moleculelor de ADN întrebuinţate ca primer. O confirmare spectaculară a acestei ipoteze au făcut-o Furth şi colab. (1961). Ei au introdus, în sistemul de sinteză a ARN, un ADN sintetic compus numai dintr-o singură bază, timina. Rezultatul a fost că în prezenţa celor 4 ribonucleozid-trifosfaţi ai ARN, polimeraza ARN a polimerizat numai ATP, obţinîndu-se exclusiv acidul poliriboadenilic. Prin urmare, această enzimă a sintetizat exact polimerul complementar primerului adăugat sistemului de reacţie.

Descoperirea polimerazei ARN a permis să se demonstreze experimental mecanismul reacţiei de sinteză a ARN-*M* şi totodată să dovedească direct posibilitatea transmiterii informaţiei genetice de la ADN la ARN.

Inhibiţia sintezei proteinelor. Hurwitz şi colab. (1962) au observat că actinomicina D în concentraţii de 0,1—0,2 μM inhibă creşterea *Bacillus subtilis*. Ei au putut chiar stabili că în urma acestui tratament sinteza proteinelor a fost inhibată în proporţie de 75%, aceea a ARN de 90—95% iar a ADN numai într-o mică măsură. Întrucît actinomicina D are proprietatea de a se complexa cu ADN (Nakata şi colab., 1961), rezultatele obţinute au permis să se presupună că sinteza ARN şi a proteinelor este controlată de ADN.

Pe de altă parte s-a observat că virusurile poliomielitice, Mengo, fagii MS_2 şi f_2 care conţin ARN ca material genetic (vezi polimeraza virală), s-au

putut multiplica în prezenţa actinomicinei D, ceea ce a demonstrat că aceste virusuri se sintetizează independent de ADN celular. Toate aceste rezultate au permis să se stabilească mecanismul prin care actinomicina D acţionează asupra sintezei proteinelor şi anume : actinomicina D complexînd ADN împiedică prin aceasta sinteza ARN-*M* pe modelul ADN. Ca o consecinţă, scade cantitatea de ARN-*M* şi, implicit, sinteza proteinelor controlate de el. Cercetările obţinute cu actinomicina D au condus astfel la două concluzii de primă importanţă :

a) Sinteza proteinelor este controlată de acidul ribonucleic prin intermediul ARN-*M*.

b) Multiplicarea virusurilor ARN şi sinteza proteinelor virale au loc fără intervenţia ADN celular.

Participarea ribozomilor la sinteza proteinelor. S-a remarcat că sistemele acelulare de sinteză a proteinelor din *E. coli* au nevoie de o concentraţie ridicată de Mg^{++}($\sim 10^{-2}$M). Această concentraţie favorizează formarea ribozomilor mari de 70 *S* din subunităţile de 30 *S* şi 50 *S*. În schimb, după încorporarea acizilor aminaţi, ribozomii care posedă lanţuri polipeptidice nou sintetizate sînt mai puţin susceptibili de a se desface în ribozomi de 30 *S* şi 50 *S*. Totuşi, dacă după sinteză extractele acelulare sînt supuse unei dialize scurte faţă de Mg^{++} (10^{-4} M), aproximativ 80 pînă la 90 % din ribozomii de 30 *S* şi 50 *S* devin liberi. În acelaşi timp s-a observat că 10 pînă la 20 % din ribozomii originali de 70 *S* rămîn nedisociaţi şi pe aceştia sînt localizate proteinele nou sintetizate. Din aceste rezultate, Tissières şi colab. (1960) au dedus că sinteza proteinelor are loc pe ribozomii mari de 70 *S* şi că numai o parte din ribozomi participă la sinteza proteinelor, fracţiune ce a primit denumirea de „ribozomi activi" care conţin probabil o componentă funcţională care lipseşte celorlalţi ribozomi.

Aceiaşi autori au mai constatat că adăugarea de DN-ază în sistemul acelular de *E. coli* determină o sinteză de numai 20—40 % din cantitatea sintetizată cu extractele netratate. S-a dedus de aici că ADN are un anumit rol în sinteza proteinelor. Deoarece după distrugerea ADN sinteza proteinelor a rămas constantă s-a presupus că ADN participă indirect la sinteza proteinelor şi că în urma tratamentului cu DN-ază a fost impiedicată formarea noilor matriţe de ARN-*M* pe modelul ADN. Prin urmare, DN-aza a distrus numai capacitatea ADN de a sintetiza ARN-*M* în timp ce ARN-*M* prezent în extractele acelulare a continuat să participe la sinteza proteinelor. Această presupunere s-a dovedit a fi adevărată, deoarece adaosul de ADN la extractele anterior denudate cu DN-ază a determinat creşterea din nou a încorporării acizilor aminaţi (Tissières şi Hopkins, 1961). Experienţele ulterioare au adus noi precizări în privinţa participării ribozomilor la sinteza proteinelor. S-a dovedit că sistemele acelulare de *E. coli* conţin 10 pînă la 20 % din ribozomi ataşaţi de ARN-*M*. Prin centrifugarea în gradient de zaharoză

Scanned with OKEN Scanner

a extractelor obținute din celulele infectate cu T_2 s-a remarcat că ribozomii care conțin ARN mesager se separă mai repede decît ceilalți ribozomi. Mai mult decît atît s-a putut observa că lanțurile nou sintetizate de proteină sînt legate tot de fracțiunea de ribozomi care sedimentează mai repede. Deci, acești ribozomi, „ribozomii activi", conțin atît ARN-*M* cît și proteinele nou sintetizate.

Sistemul de sinteză a fost tratat apoi cu RN-ază, pentru a hidroliza ARN-*M*; după centrifugare s-a constatat că proteina nou sintetizată a sedimentat o dată cu ribozomii de 70 *S*. S-a dedus de aici că această proteină nu este legată de ARN-*M*; în schimb este atașată direct de ribozomii mari.

Cercetări recente realizate cu ARN din virusul Mengo (Tobey, 1964) sau cu ARN din virusul poliomielitic (Rich și colab., 1963) au adus noi dovezi în favoarea aceleiași idei : s-a demonstrat că ARN viral se fixează pe ribozomi organizîndu-i în „polizomi" pentru ca apoi aceștia să sintetizeze proteina virală specifică. În acest fel s-a dovedit pe de o parte că ARN viral „întrebuințează" ribozomii celulari pentru sinteza proteinelor sale, iar pe de alta că rolul fundamental în acest proces îl au polizomii.

La microscopul electronic, polizomii par să aibă o structură liniară datorită faptului că ei sînt constituiți probabil din ribozomi uniți între ei prin lanțul de ARN-*M*. În prezența unei cantități mici de RN-ază, polizomii sînt transformați în ribozomi, ceea ce dovedește rolul ARN în formarea polizomilor (Rich și colab., 1963).

Întrucît se consideră că la un moment dat un anumit ribozom funcțional conține numai un singur lanț polipeptidic în creștere, pot exista două posibilități de funcționare a polizomilor (Ochoa, 1964) :

a) ARN-*M* se mișcă pe suprafața statică a ribozomilor determinînd în acest timp legarea succesivă a acizilor aminați într-un lanț polipeptidic.

b) Ribozomii sînt aceia care se deplasează de-a lungul ARN-*M*, pentru a realiza același proces de sinteză a proteinelor.

Ilustrarea schematică a modului de acțiune a polizomilor este prezentată în figura 126.

O problemă deosebit de importantă este aceea a mărimii lanțurilor polipeptidice sintetizate de polizomi. Majoritatea rezultatelor experimentale arată că proteinele native sînt formate din agregate de subunități de o mărime relativ mică. În cazul hemoglobinei, a proteinei VMT, a apoferitinei, greutatea moleculară a subunităților proteice este cuprinsă între 15 000 și 25 000, ceea ce corespunde unui lanț molecular care conține aproximativ 200 de acizi aminați. În unele cazuri însă există posibilitatea ca subunitățile primare să sufere un proces de agregare sub controlul genetic al sistemului de sinteză proteică celulară, dînd astfel naștere proteinelor native înalt polimerizate.

Scanned with OKEN Scanner

Legarea ARN-S de ribozomi. S-a putut demonstra că, în prezenţa ionilor de Mg^{++} în concentraţie de 10^{-2} M, fiecare subunitate de ribozom 50 *S* are legat de ea o moleculă de ARN-*S*. În schimb, în absenţa sintezei proteice, la o concentraţie de 10^{-4} M a ionilor de Mg^{++}, ARN-*S* nu mai rămîne ataşat de ribozomi. Pe de altă parte, după încorporarea acizilor aminaţi, moleculele de ARN-*S* se găsesc fixate de ribozomii activi. Fiecare moleculă de ARN-*S* pare a fi ataşată de cîte un ribozom.

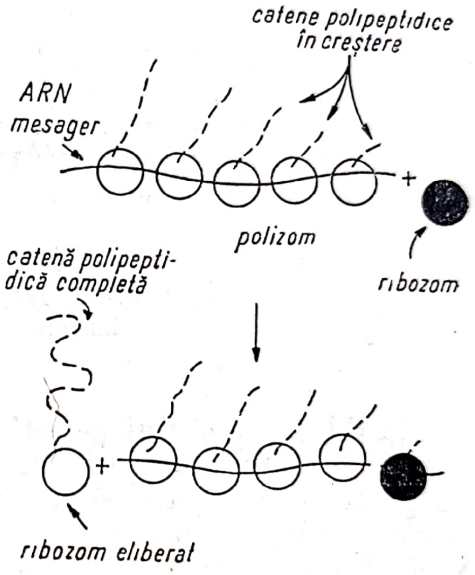


Fig. 126. — Reprezentarea schematică a modului de acţiune a polizomilor în sinteza proteinelor (după Ochoa, 1964).

Faptul că toţi ARN-*S* şi aproape întreaga cantitate de proteină nou formată pare a fi legată de componentele active ale ribozomilor, a sugerat ipoteza că molecule de ARN-*S* sînt legate direct de proteina nou formată.

O dovadă directă în favoarea acestei ipoteze au adus-o lucrările lui Gilbert (1963). Acest autor a arătat că în urma tratamentului cu Duponol — cînd ribozomii de 50 *S* se disociază în proteină şi ARN — proteina nou sintetizată se separă împreună cu ARN-*S* atît prin centrifugare în gradient de zaharoză cît şi prin separare pe coloană de Sephadex. În schimb prin tratamentul cu alcali sau hidroxilamină, care desfac legăturile aminoacilice, proteina nou sintetizată ca şi ARN-*S* se fracţionează separat.

După toate probabilităţile proteina nou sintetizată nu este menţinută prin legături covalente de ribozomi. Mai degrabă este posibil ca aceasta să fie fixată împreună cu ARN-*S* în cavitatea ribozomilor activi prin legături secundare a căror tărie depinde de ionii Mg^{++} (Watson, 1963).

Creşterea lanţului polipeptidic. După Bishop şi colab. (1960) şi Bintzes (1961) creşterea lanţului polipeptidic începe prin adiţionarea treptată a acizilor aminaţi păstrînd liber capătul NH_2 al primului acid aminat (AA_1)

angajat în sinteză. Al doilea acid aminat (AA_2) formează legătura peptidică prin reacţia dintre gruparea sa aminică şi carboxilul primului acid aminat, ca în figura 127.

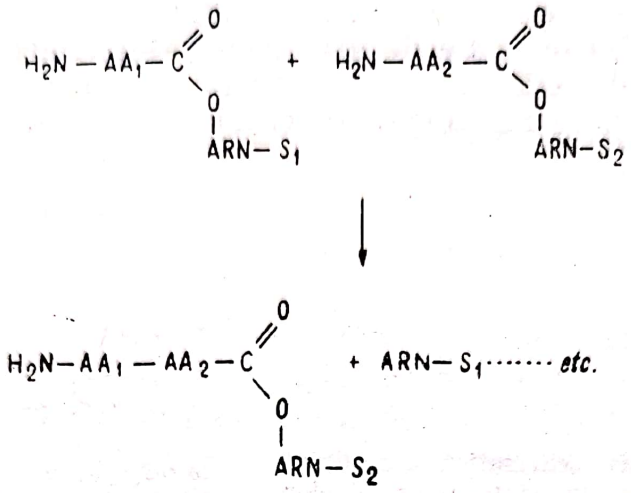


Fig. 127. — Mecanismul creşterii lanţului proteic (după Watson, 1963).

Problema codului genetic al acizilor nucleici. Ideea codului genetic sub forma sa actuală a fost generată de cercetările care au demonstrat pe de o parte participarea şi rolul acizilor nucleici în sinteza proteinelor, iar pe de alta caracterul organizat al structurii primare a acizilor nucleici şi a proteinelor. Analizele chimice efectuate asupra proteinelor au arătat că specificitatea lor este determinată în primul rînd de succesiunea acizilor aminaţi în lanţul lor polipeptidic. Cercetări similare, dar al căror stadiu este mult mai puţin avansat par să demonstreze că şi specificitatea acizilor nucleici este condiţionată de secvenţa bazelor din macromolecula lor.

Întrucît acizii nucleici sînt aceia care dirijează sinteza proteinelor s-a presupus în mod logic că informaţia genetică după care se înlănţuie acizii aminaţi într-o proteină anumită, este înscrisă în secvenţa bazelor din lanţul lor.

Deoarece acizii nucleici conţin în general 4 baze diferite iar numărul acizilor aminaţi dintr-o proteină este de obicei de 20, problema principală pe care trebuie să o rezolve codul genetic este de a găsi modul în care sînt aranjate de-a lungul macromoleculei cele patru baze, astfel încît să poată codifica cei 20 de acizi aminaţi.

Pînă în prezent s-au propus numeroase variante de combinare a bazelor cu scopul menţionat. Cu aceste ocazii s-a remarcat că asocierea a două baze sub formă de dublete (de exemplu AU, UC, UU etc.), fiecare din acestea fiind specifică pentru un acid aminat, permite formarea de numai $4^2 = 16$ combinaţii. Or, proteinele conţin 20 de acizi aminaţi; deci codul bazat pe dublete devine nesatisfăcător. Pe de altă parte, trei baze (AAC, CAC etc.) dau naştere la 4^3 sau 64 combinaţii, care de data

aceasta sînt prea multe pentru cei 20 de acizi aminați. În aceeași ordine de idei vom menționa că sînt și alte încercări de a codifica acizii aminați.

Este interesant de menționat că, pe baza unor cercetări practice, Crick și colab. (1961) au adus primele dovezi experimentale în favoarea codului genetic bazat pe triplete. Totodată, experiențele au sugerat ideea că acest cod este „degenerat", adică pentru codificarea unui acid aminat dat este nevoie de mai mult decît un singur triplet. În acest fel, corecția care s-a impus codului bazat pe triplete vine să explice rostul tuturor celor 64 de triplete ce se pot forma cu cele 4 baze diferite. Pentru setul de baze care codifică un acid aminat, Crick a propus termenul de „codon".

În discursul pe care l-a ținut cu ocazia decernării premiului Nobel, Crick (1963) a caracterizat astfel proprietățile generale ale codului genetic :

1) Cei mai mulți dacă nu toți codonii conțin trei baze (adiacente).

2) Codonii adiacenți nu se suprapun.

3) Mesajul este citit exact în grupe de trei, începînd de la un anumit punct fix.

4) Secvența codului în genă este coliniară cu secvența acidului aminat, lanțul polipeptidic fiind sintetizat succesiv începînd cu gruparea amino terminală.

5) În general, fiecare acid aminat este codificat de mai mult decît de o tripletă.

6) Nu este sigur dacă unele triplete nu pot codifica mai mult decît un acid aminat. Ele pot fi cu două sensuri.

7) Tripletele care codifică același acid aminat sînt probabil similare.

8) Nu se știe dacă există o anumită regulă generală care grupează codonii împreună sau dacă gruparea este rezultatul principal al unui accident istoric.

9) Numărul tripletelor care nu codifică un acid aminat este probabil mic.

10) Unele coduri propuse anterior, de exemplu codul „comma-less", codurile a două sau trei litere, codul combinației și diferite coduri transposibile sînt probabil incorecte.

11) Diferitele organisme au probabil un cod similar. El poate fi același în toate organismele dar acest fapt nu este încă cunoscut.

Problema codului genetic a putut fi studiată direct grație descoperirii făcute de Nirenberg și Matthaei (1961) prin care s-a demonstrat că într-un sistem acelular acizii ribonucleici sintetici pot fi întrebuințați pentru sinteza proteinelor.

Rezultatele obținute în această direcție cu ARN sintetici cu diferite compoziții în baze, de grupul de cercetători condus de Ochoa pe de o parte și de Nirenberg pe de alta, au reușit să precizeze tripletele de baze care codifică un acid aminat dat. Din tabloul 18 rezultă că lizina este codificată de tripleta AAA, fenil-alanina de tripleta UUU etc.

Este important de menționat că rezultatele obținute de Nirenberg și colab. (1963) sînt (cu mici excepții) în bună concordanță cu cele publicate de Ochoa și colab. (1963).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 18

Distribuţia acizilor aminaţi între triplete (după Ochoa, 1964)

Seriile tripletelor	Triplete	Acizii aminaţi
1	AAA	Lis.
2	UUU	F.A.
3	CCC	Pro
4	GGG	—
5	AUU, UAU, UUA	Tir. Leu. Ileu.
6	AGG, GAG, GGA	— Glic. — —
7	ACC, CAC CCA	His. Pro. Tir.
8	UAA, AUA, AAU	Asp. Lis. Ileu.
9	UGG, GUG, GGU	Tir. Glic.—
10	UCC, CUC, CCU	Ser. Pro. Leu.
11	GAA, AGA, AAG	Arg.— Glu.
12	GUU, UGU, UUG	Cis. Leu. Val.
13	GCC, CGC, CCG	Arg. — Ala.
14	CAA, ACA, AAC	Asp. u Tir. u Glu.
15	CUU, UCU, UUC	Ser. FA. Leu.
16	CGG, GCG GGC	— Glic.—
17	AUG, AGU, UAG, UGA, GAU, GUA	Glu. Met.— — —Asp.
18	AUC, ACU, UAC, UCA, CAU, CUA	His. Tir. Glu. Treo. Ileu. Asp.
19	AGC, ACG, GAC, GCA, CAG, CGA	— Ser.—Asp. Ala.—
20	UGC, UCG, GUC, GCU, CUG, CGU	— —Arg.—Ala.

În acest fel, polinucleotidele sintetice care au luat locul ARN-*M* naturali au reuşit să aducă primele dovezi directe în favoarea existenţei codului genetic al acizilor nucleici.

Elucidarea completă a mecanismului molecular al eredităţii necesită însă încă numeroase cercetări asupra sistemului de replicare a ADN şi ARN, sintezei ARN-*M* şi biosintezei proteinelor.

În ceea ce priveşte codonii acizilor aminaţi formulaţi pe baza cercetărilor realizate cu ARN sintetici, ei nu pot fi consideraţi ca definitiv stabiliţi. Studiile în curs de realizare în diferite laboratoare conduc fie la confirmarea, fie la revizuirea lor.

Universalitatea codului. Există în prezent numeroase date experimentale care pledează pentru universalitatea codului genetic. Pe baza lor se preconizează ideea unui singur sistem de transmitere a informaţiei genetice pentru toate organismele.

Astfel, faptul discutat mai înainte, în care ARN din VMT, introdus într-un sistem acelular preparat din *E. coli* determină sinteza unei proteine de VMT, demonstrează că mesajul indus de un acid nucleic viral este recunoscut de sistemul de sinteză proteică al bacteriei.

O altă dovadă în favoarea aceleiaşi concepţii a adus-o lucrarea lui von Ehrenstein şi Lipmann (1961). Ei au observat că ribozomii din reticulocite de iepure, amestecaţi cu un supernatant de *E. coli*, determină încorporarea în hemoglobină a leucinei din combinaţia leucil-C ^{14}-ARN-*S* obţinută

tot din *E. coli*. Aceasta înseamnă că tripleta de adaptare a ARN-*S* din *E. coli* a fost capabilă să se fixeze de tripleta complementară a ARN-*M* al hemoglobinei de iepure.

În sfîrșit, pentru a ne opri numai la cîteva date experimentale, vom aminti cercetările lui Weinstein și Schachter (1962), Arnstein și colab. (1963) și (1964). Aceștia au dovedit că sistemele acelulare preparate din celulele mamiferelor induc sub influența unor polinucleotide sintetice sinteza unor proteine, printr-un mecanism asemănător cu acela realizat de sistemele similare de *E. coli*. Prin urmare, rezultatele prezentate conduc la aceeași concluzie și anume că în toate organismele există un singur cod genetic.

Mecanismul sintezei proteinelor. Multiplele cercetări inițiate în scopul elucidării mecanismului de sinteză al proteinelor, dintre care o parte au fost prezentate succint în acest capitol, au permis să se formuleze etapele principale ale acestei sinteze.

Ca o constatare fundamentală care se desprinde din rezultatele descrise poate fi considerată participarea directă a ARN în sinteza proteinelor. Majoritatea observațiilor experimentale demonstrează că în această biosinteză intervenția ARN are loc prin intermediul ARN-*M*. În același timp s-a putut preciza că înlănțuirea acizilor aminați într-un lanț polipeptidic, ceea ce determină de fapt natura proteinei sintetizate, este determinată de secvența specifică a nucleotidelor din lanțul ARN-*M*. Acesta din urmă, fie că este sintetizat pe modelul ADN din nucleu de către polimeraza ARN dependentă de ADN, cazul general al sintezei proteinelor celulare, fie că este sintetizat de către polimeraza virală dependentă de ARN viral, care induce sinteza proteinelor specifice.

În continuare ne vom referi la mecanismul general al sintezei proteinelor celulare, deoarece cazul particular al sintezei proteinelor virale va fi discutat o dată cu problema infectivității ARN virali.

Numeroase dovezi experimentale existente pînă acum conduc la ideea că ADN este substratul eredității, iar informația genetică este întipărită în macromoleculă în secvența bazelor sale azotate. Trebuie însă menționat că ARN viral constituie materialul „genetic" al virusurilor ARN. În acest fel, poziția ARN viral ca material genetic este unică, deoarece în orice celulă informația genetică este localizată în ADN. Mai mult chiar, s-a putut demonstra că multiplicarea virusurilor-ARN și sinteza proteinelor are loc fără intervenția ADN celular.

Există de asemenea suficiente argumente care să ateste că în celule sinteza proteinelor este controlată genetic. Întrucît ADN este localizat în nucleu în timp ce majoritatea sintezei proteice are loc în citoplasmă participarea directă a ADN la acest proces este exclusă.

Locul sintezei proteice s-a dovedit a fi suprafața ribozomilor. Aceștia sînt activi numai în prezența ARN-*M*, care are proprietatea de a-i agrega sub formă de polizomi.

În schimb, sinteza ARN-*M* are loc în nucleu, pe modelul ADN sub controlul direct al polimerazei ARN. În acest fel, copierea secvenței

bazelor ADN în molecula ARN-*M* sau „transmiterea" mesajului genetic de la ADN la ARN este condiţionată de o enzimă.

Ulterior ARN-*M* trece în citoplasmă unde, printr-un mecanism complex, determină „transcrierea" mesajului genetic constituit din cele 4 baze azotate în limbajul celor douăzeci de acizi aminaţi ai proteinelor.

Considerînd, conform ipotezei celei mai admise, că un acid aminat este codificat de către 3 baze azotate din lanţul ARN-*M*, transmiterea mesajului genetic de la ADN la sinteza proteinelor poate fi redat schematic, după Ochoa (1964), astfel :

ADN	—TTC	TTT	CAA	CTC	TAA	AAG	CGC	ATA	TCA	AAA	CAG	GGG
					etapa 1							
ARN-*M*	—AAG	AAA	GUU	GAG	AUU	UUC	GCG	UAU	AGU	UUU	GUC	CCC
					etapa a 2-a							
Proteine	—Glut.	Liz.	Cis.	Glic.	Tir.	Leuc.	Glic.	Leuc.	Met.	F.al.	Arg.	Pro.

Schema presupune că numai o catenă a ADN este copiată de ARN-*M*. Formularea se bazează pe o serie de experienţe care au dovedit că *in vitro* polimeraza ARN desface cele două catene de ADN, iar sinteza ARN-*M* are loc numai pe una din ele (Chamberlin şi Berg, 1962 ; Champe şi Beuzer, 1962). ARN-*M* astfel sintetizat aduce informaţia genetică la ribozomi, locul sintezei lanţurilor polipeptidice.

Pe de altă parte s-a putut demonstra că acizii aminaţi se încorporează în proteine numai atunci cînd ei sînt activaţi de enzimele de pH 5, în prezenţa ATP (Hoagland şi colab., 1956 ; Berg, 1956). Prezenţa enzimelor de pH 5, denumite şi „enzimele de activare" datorită proprietăţii lor de a transforma acizii aminaţi în forma lor mai reactivă de anhidride, a fost pusă în evidenţă în diverse celule. Astfel, Eggleston (1958) le descrie în microorganisme, Rendi (1958) în pancreas etc. Se pare că activarea acizilor aminaţi este specifică şi că există multiple enzime de activare, fiecare acţionînd pentru un acid aminat dat. Astfel, Bergman şi colab. (1961) au arătat că enzimele izolate şi purificate de ei activează numai L-leucina şi L-metionina, iar faţă de alţi acizi aminaţi sînt inactive. Anterior, Davie şi colab. (1956) au izolat enzima de activare a triptofanului, iar Hoagland şi colab. (1957) pe aceea a metioninei.

Fiecare enzimă de activare catalizează două reacţii (Perutz, 1962) : prima are loc între gruparea carboxilică a acidului aminat şi gruparea fosforică a ATP, avînd ca rezultat eliberarea ionului de pirofosfat şi formarea aminoacidului adenilatului ; a doua reacţie, catalizată de aceeaşi enzimă de activare, constă în transferul acidului aminat fixat în primul moment de gruparea fosforică a AMP la hidroxilul *2'* sau *3'* al ribozei din nucleozidul terminal (adenozina) al ARN-*S*.

Reacţia a doua se petrece însă în două etape : în prima ARN-*S* este activat de CTP conform reacţiei :

$$\text{ARN-}S + \text{CTP} \rightleftarrows \text{ARN-}S\text{-CMP} + \text{PP}$$

ARN-*S* astfel activat reacționează apoi în etapa a doua cu aminoacil-adenilatul prin reacția arătată în figura 128.

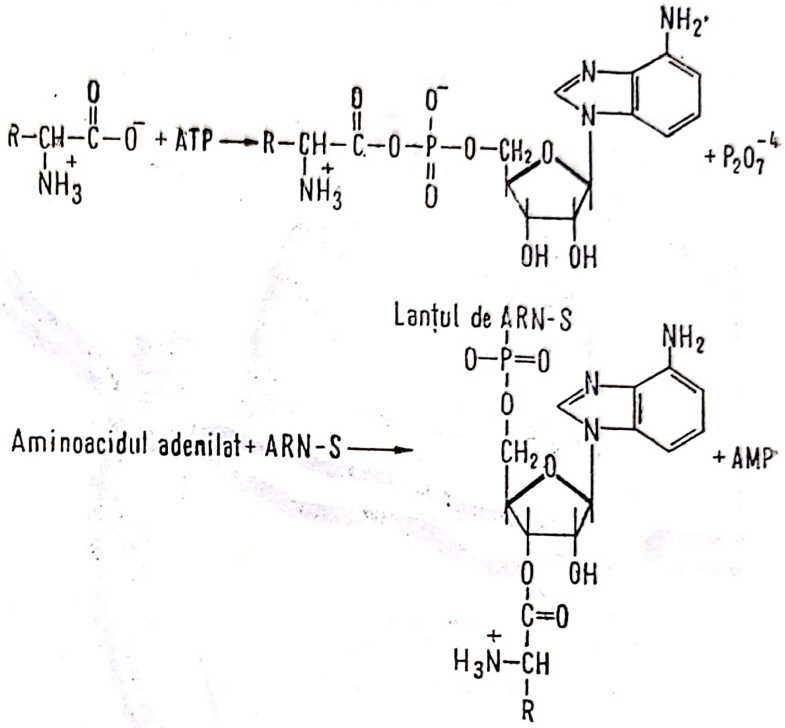


Fig. 128. — Activarea acidului aminat și cuplarea lui de ARN-*S* (după Perutz, 1962).

În legătură cu formarea complexului dintre acidul aminat activat și ARN-*S* s-a pus întrebarea dacă există un singur tip de ARN-*S* care se combină cu toți acizii aminați sau există mai mulți ARN-*S* specifici pentru fiecare acid aminat în parte.

Ipoteza lui Crick (1959), după care pentru fiecare aminoacid există un ARN-*S* specific, s-a dovedit a se baza pe cele mai multe argumente teoretice și experimentale. Conform acestei ipoteze, ARN-*S* are un rol de „adaptor", manifestat prin proprietatea de a conține în interiorul moleculei sale, sub forma unei secvențe scurte de baze (probabil trei), codul care îi permite să se atașeze specific de ARN-*M* (fig. 129). După Zubay (1963), ARN-*S* cuplat cu acidul aminat se leagă de ARN-*M* prin intermediul celor trei baze neîmperechiate situate la mijlocul moleculei sale (vezi structura secundară a ARN-*S*). Un argument în favoarea acestor presupuneri poate fi considerat faptul că lățimea moleculei de ARN-*S* este egală cu lungimea unei triplete din ARN-*M*.

ARN-*S* cuplați cu acizii aminați, a căror prezență la nivelul ribozomilor activi a fost demonstrată, se leagă cu formarea de punți de hidrogen între tripletele lor adaptatoare și tripletele complementare ale ARN-*M*.

Diferiții acizi aminați aduși de ARN-*S* ajung astfel în situația de a fi „aliniați" într-o ordine strictă, condiționată de tripletele ARN-*M*. Întotdeauna gruparea carboxilică a primului acid aminat reacționează cu gruparea NH_2 a acidului aminat următor, astfel că gruparea NH_2

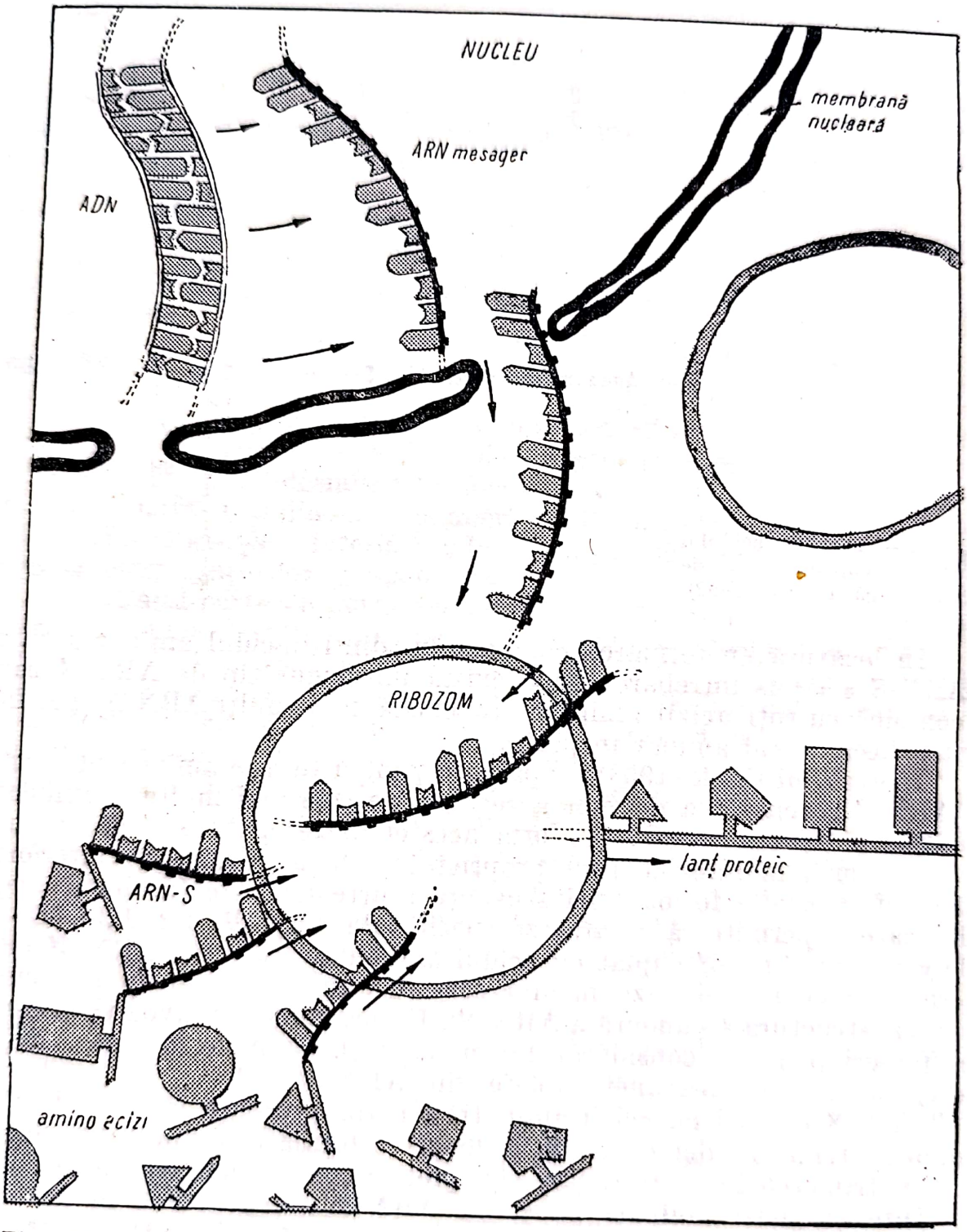


Fig. 129. — Schema sintezei proteinelor la nivelul ribozomilor dirijată de ADN din nucleu prin intermediul ARN-*M* (după Crick, 1962).

Scanned with OKEN Scanner

de la primul acid aminat rămîne capătul liber al lanțului proteic sintetizat (fig. 130).

Încorporarea acizilor aminați în lanțul polipeptidic pare a fi catalizată de o enzimă specifică, denumită polipeptid-polimeraza (Nathaus și Lipmann, 1961).

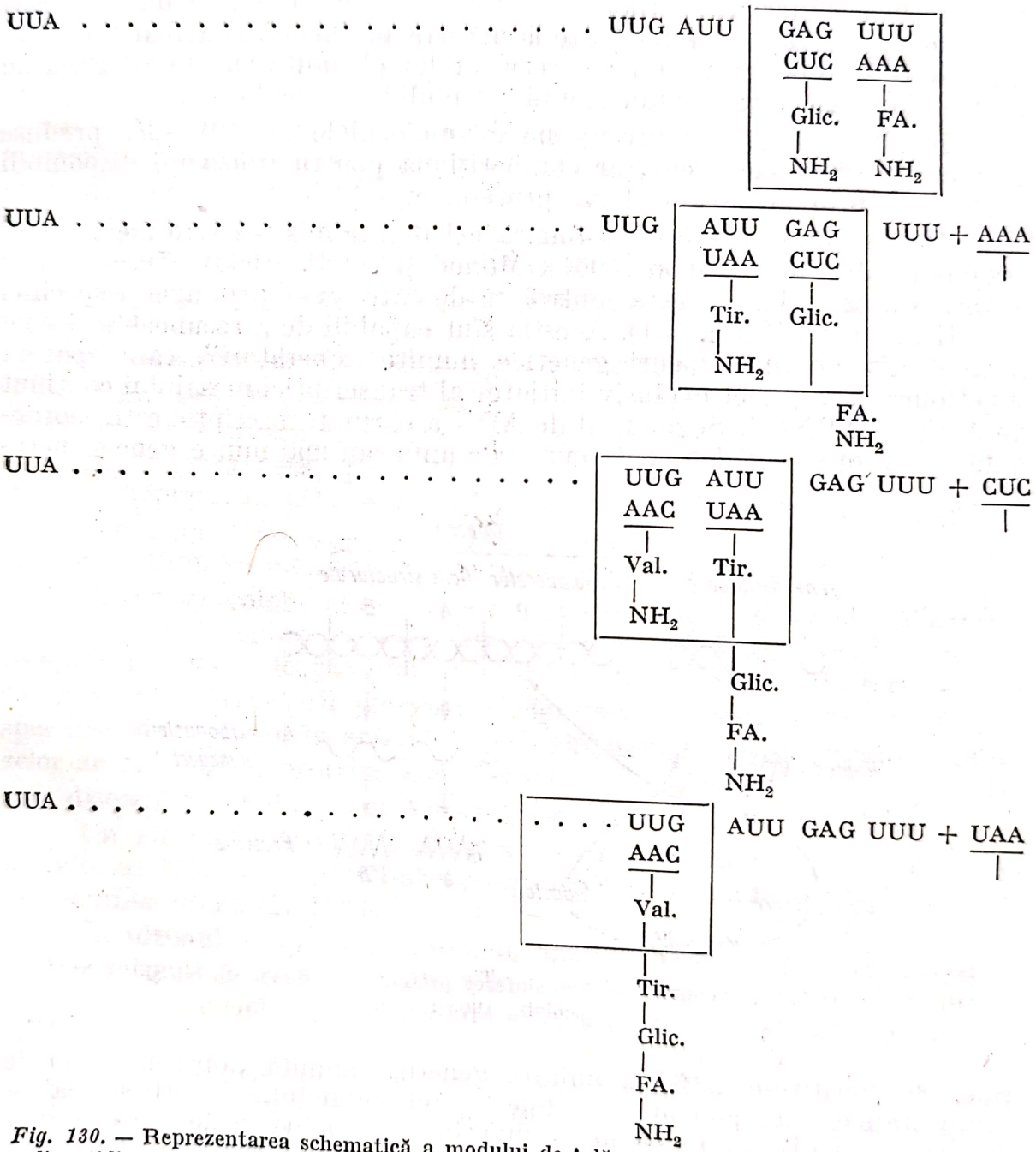


Fig. 130. — Reprezentarea schematică a modului de înlănțuire a acizilor aminați într-un lanț polipeptidic, sub influența ARN-*M*. În schemă, ARN-*S* sînt reprezentați prin litera *T*. Tripleta lor este reprezentată de cele trei litere așezate deasupra literei *T*, iar gruparea aminică liberă a acizilor aminați este trecută sub litera *T* (după Ochoa, 1964).

Reglarea sintezei proteinelor. Pînă în prezent s-au propus mai multe mecanisme de reglare a sintezei proteice. Acestea au fost elaborate pe baza unor cercetări realizate pe microorganisme. Trebuie remarcat că deşi majoritatea dintre ele au la bază numeroase dovezi experimentale, totuşi natura moleculară a mecanismului de reglare a sintezei proteinelor nu este încă cunoscut. Totodată cunoştinţele actuale din domeniul organismelor multicelulare, referitoare la această problemă, sînt foarte puţine. Din această cauză transpunerea rezultatelor obţinute cu microorganisme pe un plan mai larg trebuie făcută cu multă prudenţă.

Kyeldgoard (1961) presupune că moleculele de ARN-*M*, produse directe ale diferitelor gene, ar competiţiona pentru ribozomii disponibili controlînd prin aceasta sinteza proteinelor.

Deosebit de ingenios şi totodată cel mai admis azi este mecanismul propus de Jacob şi Monod (1961), Monod şi colab. (1963). După aceşti autori, sinteza ARN-*M* este controlată de către gene prin agenţi specifici numiţi „represori" (fig. 131). Aceştia sînt capabili de a recunoaşte şi de a lega electiv anumite locuri genetice numite „operatori", care aparent funcţionează ca punct exclusiv iniţiator al transcripţiei mesajului conţinut de ADN în ARN-*M*. Segmentul de ADN a cărui transcripţie este coordonată de un operator dat poate cuprinde unul sau mai multe gene structu-

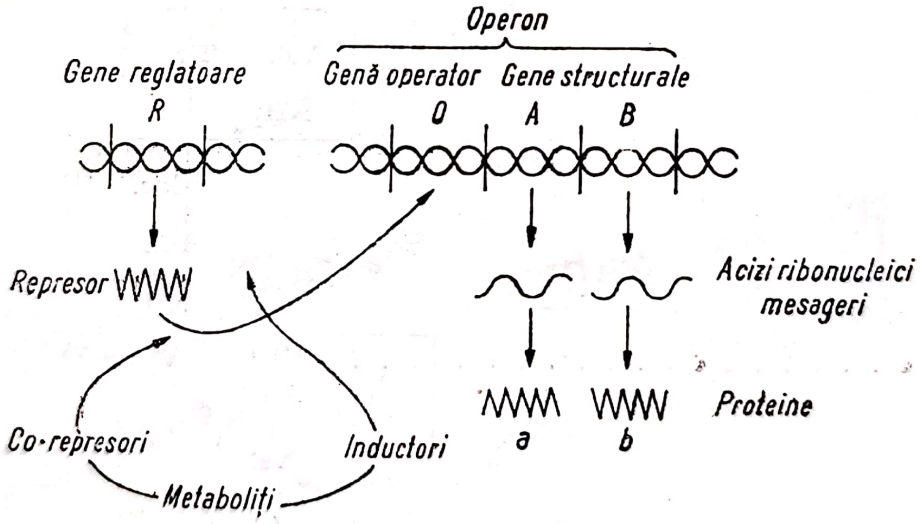


Fig. 131. — Schema reglării sintezei proteinelor (după Monod şi colab., 1963).

rale. Se constituie astfel o unitate genetică numită „operon". Genele structurale din componenţa unui operon sînt legate între ele atît spaţial — deoarece sînt dispuse în segmente învecinate ale lanţului de ADN, angrenate între ele — cît şi funcţional — deoarece ele iau parte la elaborarea unui grup de enzime care catalizează reacţiile succesive ale unei verigi oarecare a metabolismului.

Sinteza proteinelor este guvernată de represorul omolog sintetizat sub controlul unei gene „reglator" specializată. În cromozomi, gena reglatoare şi operonul „în subordine" sînt de obicei disociate spaţial, adică dispuse în segmente diferite ale lanţului de ADN cromozomial.

În cele mai multe, dacă nu în toate cazurile, activitatea represorului, adică capacitatea sa de a lega operatorul corespunzător, este controlată printr-un mecanism de conexiune inversă de compuşi specifici moleculari mici. Ei acţionează ca *efectori pozitivi*, activînd represorul şi prin urmare blocînd mesagerul şi sintezele proteice, sau ca *efectori negativi*, inhibînd represorul şi prin urmare inducînd sintezele mesagerului şi a proteinei (proteinelor). Efectorii represori pozitivi sînt numiţi „corepresori" în timp ce efectorii represori negativi sînt numiţi „inductori".

În ceea ce priveşte natura represorului, acesta este considerat astăzi o proteină prezentă în celule în cantităţi excesiv de mici. Experienţele *in vivo* au dus la următoarele concluzii privind interacţiunea inductor-represor-operator:

a) stereospecificitatea interacţiunii este remarcabilă;

b) interacţiunea este virtual imediată şi reversibilă, fiind completă în ambele direcţii în mai puţin de 15 sec;

c) o singură genă, probabil un singur constituent macromolecular specific, represorul, este responsabil pentru specificitatea interacţiunii;

d) o singură mutaţie a acestei gene suprimă interacţiunea represor-efector în timp ce conservă afinitatea represor-operator.

Monod şi colab. (1963) socotesc represorul o proteină alosterică posedînd doi receptori, nesuperpozabili, stereospecific diferiţi: unul — receptorul activ — leagă operonul, iar celălalt — locul alosteric — este complementar structurii efectorilor represori. Se presupune că efectele specifice ale acestora în activarea sau inhibarea la nivel genetic a sintezelor de ARN-*M* şi proteină sînt mediate de tranziţia alosterică, o alterare discretă reversibilă a structurii moleculare a represorului.

Un alt mecanism de reglare a sintezei proteinelor este bazat pe activitatea hidrolitică a RN-azei asupra ARN-*M*, manifestată la nivelul ribozomilor (Schmid, 1964).

În ultimul timp s-au acumulat date experimentale care dovedesc că mecanismul biosintezei proteinelor în celulă nu este controlat numai de activitatea genelor structurale de a regla o sinteză ARN-*M* pe modelul ADN.

Recent, s-a pus în evidenţă un tip nou de ribonucleoproteine intracelulare numite „informozomi", constituite din ARN-*M* şi proteine. Acestea se pare că au un rol important în transmiterea mesajului conţinut în ARN-*M*. Se consideră că ARN-*M* complexat sub această formă, trece din nucleu în citoplasmă, iar activitatea lui depinde de prezenţa unor

metaboliţi celulari care îl eliberează de proteină (figura 132). Atît timp cît proteina informozomală este ataşată de ARN-*M*, ea îl împiedică să codifice sinteza proteinelor la nivelul ribozomilor. Proteina informozo-

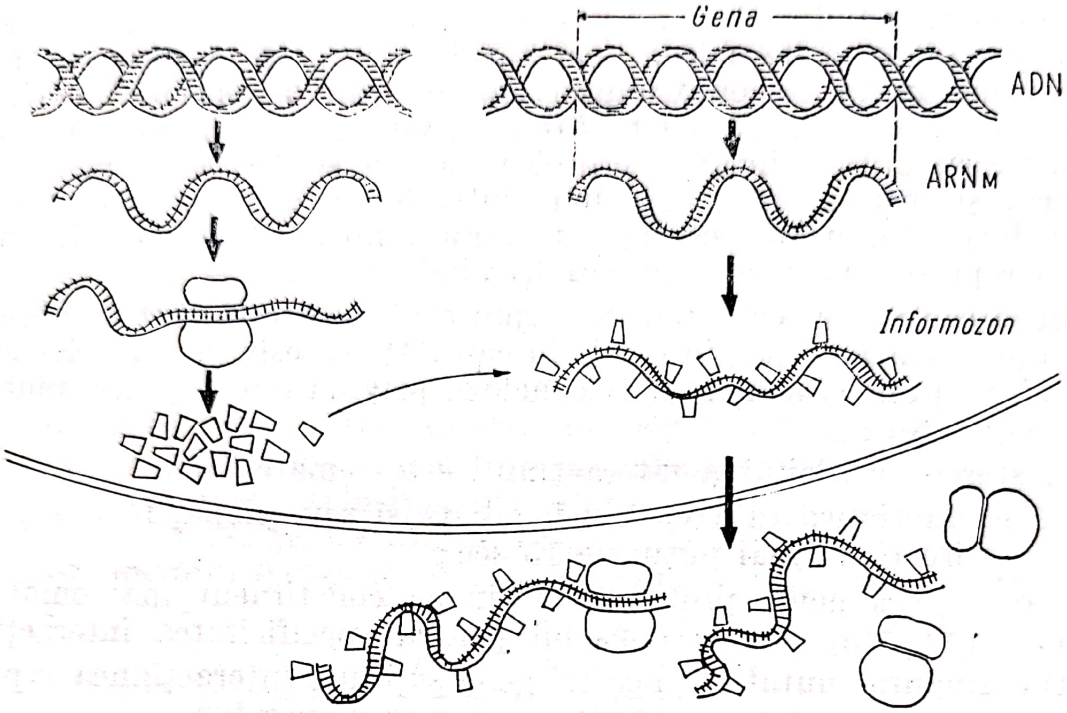


Fig. 132. — Mecanismul intervenţiei informozomilor în reglarea sintezei proteinelor (după Spirin, 1965).

mală ar avea deci un rol de „frenator", localizat pe ARN-*M*, care nu permite acestuia din urmă să se ataşeze de ribozomi şi în acest fel să transmită codul genetic (Spirin, 1965).

Acizii ribonucleici infectanţi

Una dintre proprietăţile fundamentale ale virusurilor este infectivitatea. Ea traduce capacitatea celulei „sensibile" de a multiplica corpusculul viral infectant pătruns în interiorul ei. Cu cît această multiplicare este mai masivă şi perturbările metabolice mai profunde, cu atît se consideră că infectivitatea virusului este mai mare. Dacă se poate presupune că la un moment dat, din anumite motive, o celulă îşi pierde posibilitatea de a mai multiplica un virus faţă de care, pînă atunci era sensibilă, acel virus este pe cale de dispariţie, dacă nu se găsesc alte grupe celulare care,

în noile condiţii devin sensibile. Aceste condiţii ţin pe de o parte de virus, iar pe de altă parte de celulă. Dacă unul din cei doi parteneri pierde sau dobîndeşte unele caractere se spune că virusul şi-a pierdut sau a dobîndit afinităţi noi.

Virusurile au apărut şi dăinuiesc deoarece există celule care îşi asumă sarcina de a le multiplica, de cele mai multe ori în dauna lor proprie. Se poate admite că au existat virusuri care au dispărut după cum se poate afirma că în decursul timpului vom asista la apariţia unor noi virusuri, mutante probabil ale virusurilor cunoscute astăzi. Se poate de asemenea admite posibilitatea ca la un moment dat, printr-un fenomen lent sau brusc care ar ţine de modificări metabolice celulare, virusurile să fie atît de modificate încît să-şi piardă patogenitatea sau chiar să dispară. Contrariul însă este în aceeaşi măsură posibil.

Este un pleonasm să se spună că virusurile există pentru că sînt multiplicate de celule sensibile. Şi totuşi, aşezate în afara acestor celule, virusurile nu posedă nici unul din caracterele lor. Numai în interiorul unei anumite celule, fiecare virus, în funcţie de acea celulă, este multiplicat, devine infectant, ia caractere neurotrope, dermotrope, viscerotrope sau pantrope. De asemenea, numai în celulă şi printr-un mecanism cu totul particular este imunogen. Cu alte cuvinte, numai pătruns în celulă, dar nu în toate tipurile de celulă, virusul îşi manifestă prezenţa prin perturbările produse. Această constatare, cunoscută încă din primele timpuri ale inframicrobiologiei, a făcut pe unii autori să afirme că virusurile sînt vii numai în interiorul celulei şi moarte în afara ei.

Ce sînt virusurile şi pentru ce studiul lor ocupă o specialitate aparte a ştiinţelor medicale? Bolile produse de virusuri, virozele, extrem de răspîndite în natură, afectează omul, animalele, plantele, insectele; pînă şi bacteriile cad pradă unor virusuri speciale: bacteriofagii. Pentru a ilustra în cîteva cuvinte importanţa studiului virusurilor, este suficient să reamintim că marile epidemii care au afectat omenirea sînt afecţiuni virale: variola, poliomielita, hepatitele epidemice, gripa. Este de asemenea important de ştiut că astăzi mulţi oameni de ştiinţă consideră că boala canceroasă este determinată de unul sau mai multe virusuri cu proprietăţi cu totul speciale. În cazul animalelor, apariţia epizootiilor care decimă în scurt timp şepteluri importante denotă rolul virusurilor în patologia animală. În crescătoriile de vite sînt cunoscute pesta porcină, febra aftoasă a bovideelor, encefalitele cu diferiţi agenţi virali, turbarea etc., boli temute faţă de care medicul veterinar caută permanent mijloace de combatere. Grasseriile, cu toate formele lor clinice, determinate de numeroşi inframicrobi, îmbolnăvesc şi distrug anual numeroase crescătorii de viermi de mătase. Virozele pătrund şi în stupii albinelor unde produc ravagii la fel de considerabile. Plantele plătesc şi ele un tribut greu virusurilor prin îmbolnăviri masive care afectează cerealele, legumele ca şi plantele de ornamentaţie. Este suficient să reamintim că la o plantaţie de tutun

Scanned with OKEN Scanner

în care a apărut unul din numeroasele mozaicuri, denumire dată unui întins grup de viroze ale plantelor, producţia de tutun este compromisă. Afecţiuni virale variate se pun în evidenţă necontenit la pomii fructiferi, în sere sau în răsadurile de legume. Pagubele materiale produse sînt importante deoarece planta afectată de aceste viroze dă produse de calitate inferioară, în cel mai bun caz.

Ce sînt virusurile? Considerate de unii microorganismele cele mai elementare cu cele mai reduse calităţi ale vieţii, sînt aşezate pe cea mai de jos treaptă a fiinţelor vieţuitoare. Alţi cercetători însă aşează virusurile în domeniul chimiei, pe treapta cea mai de sus a macromoleculelor lipsite de proprietăţile sau calităţile care le-ar conferi dreptul de a fi considerate vii. În sfîrşit, a treia categorie urmează calea de mijloc şi definesc virusurile ca microorganisme care fac legătura între organismele vii şi materia chimică inertă, lipsită de viaţă; ar fi vorba deci de un grup aparte care nu întruneşte totalitatea funcţiilor vitale dar care are totuşi cîteva din ele, ceea ce le ridică deasupra substanţelor chimice. Reiese în modul cel mai evident din cele de mai sus că astăzi încă cercetătorii nu s-au pus de acord în ceea ce priveşte natura virusurilor deşi studiul lor se întinde pe multe decenii şi rezultatele experimentale înregistrate sînt impresionante.

De la vechea interpretare dată de Beijérick după care inframicrobii sînt consideraţi *contagium vivum et fluidum* şi pînă astăzi, autorii au emis numeroase interpretări şi definiţii în care au vrut să incadreze, virusurile. Astfel, Bauer în 1904 atribuie virusurilor o origine endogenă fiind un *contagium fluidum et inanimatum*, lipsit deci de viaţă. Ulterior aceste microformaţiuni au fost considerate protozoare, molecule chimice, fermenţi, toxine etc.

După definiţia dată în 1938 de Nicolau, virusului herpetic, acesta ar fi: „un inframicrob puţin evoluat în scara taxonomică a microorganismelor într-atît încît nu-şi poate realiza singur metabolismul nutritiv; aceasta ar fi explicaţia parazitismului său obligator pe celula vie". În 1956, acelaşi autor reia şi completează definiţia, precizînd cu această ocazie unele caractere fundamentale ale virusurilor care sînt: „germeni extrem de mici, puţin evoluaţi, avînd loc pe primele trepte ale vieţii: sînt forme primitive de viaţă, atît de incomplet organizate încît nu-şi pot realiza singure metabolismul, ceea ce explică parazitismul obligator în celulele vii" (Nicolau, 1956).

Progresele realizate în ultimii ani în inframicrobilogie, datorită cărora s-a ajuns la o cunoaştere mai amplă a compoziţiei chimice a virusurilor, a relaţiilor dintre compuşii chimici, dar mai ales a rolului infectant al acizilor nucleici, au condus şi la unele modificări ale concepţiei despre virusuri.

După definiţia dată de Lwoff (1957) virusurile sînt entităţi nucleoproteice potenţial patogene posedînd numai un tip de acid nucleic, care

Scanned with OKEN Scanner

se reproduc din materialul lor genetic, sînt incapabile să crească şi să sufere fiziunea binară şi sînt lipsite de enzime metabolice.

Este curios faptul că în toate încercările de definire a inframicrobilor sînt invocate o serie, mai scurtă sau mai lungă, de proprietăţi negative. Acest lucru trebuie reţinut deoarece în orice discuţie asupra naturii virusurilor aceste proprietăţi negative trebuie luate în consideraţie. Astfel, virusurile nu se multiplică prin ele-însele, nu au enzime, nu au metabolisme, nu au decît unul din cei doi acizi nucleici, nu au nici o activitate în afara celulei sensibile, nu au nevoie de integritate structurală pentru a-şi manifesta infectivitatea etc. Nu este cazul să insistăm asupra acestor date, care conduc în mod inevitabil la discutarea naturii virusurilor, această discuţie ar depăşi cadrul lucrării noastre.

În decursul anilor, cercetătorii au făcut numeroase tentative de a clasifica inframicrobii, tot astfel cum microorganismele fuseseră clasate. Unele complexe, altele mai simple, utilizînd fiecare cele mai variate criterii de clasificare, aceste încercări nu au reuşit nici pînă astăzi să elaboreze o clasificare sistematică în care virusurile să fie corect incadrate.

Nicolau (1951) clasifică inframicrobii în următoarele categorii:

a) virusuri nucleoproteine, care cuprind macromoleculele cristalizabile;

b) bacteriofagii;

c) virusuri propriu-zise;

d) pararickettsiile şi myagavelele;

e) rickettsiile.

Recent, Huck (1964) încearcă o clasificare bazată pe prezenţa unuia sau a celuilalt acid nucleic, pe simetria capsidei virale, sensibilitate faţă de agenţii fizici sau chimici şi dimensii. Din această clasificare, ca şi din definiţia lui Lwoff, lipsesc pararickettsiile şi rickettsiile, germeni cu proprietăţi diferite de ceilalţi inframicrobi.

Lwoff, Anderson şi Jacob (1959) propun o nouă terminologie pentru virus şi subunităţile sale structurale, terminologie astăzi acceptată şi unanim utilizată. Aceşti autori numesc „virion" unitatea infectantă, virusul, sau ceea ce se înţelegea prin corpuscul elementar. Virionul este constituit dintr-un înveliş a cărui compoziţie este în special proteică şi care cuprinde materialul genetic. Lwoff şi colab. propun ca acest înveliş să fie numit „capsidă". Subunităţile care constituie capsida se numesc „capsomere".

Studiaţi cu ajutorul microscopului electronic, inframicrobii au arătat după colorări speciale existenţa unei aşezări orientate a capsomerelor ceea ce a determinat pe unii autori să realizeze o clasificare bazată pe această simetrie. Astfel, după Horne (1963) tipurile de simetrie în care pot fi incadrate virusurile sînt: cubică, helicală şi complexă sau combinată.

Multitudinea încercărilor de a găsi o clasificare corectă în care să poată fi încadraţi toţi inframicrobienii arată marea heterogenitate a acestora şi imposibilitatea de a preciza acele criterii care să fie unanim

Scanned with OKEN Scanner

valabile. Pînă în momentul de faţă nu s-a putut imagina clasificarea cuprinzătoare şi corectă, tot astfel cum nu s-a putut formula o definiţie completă a inframicrobilor.

De îndată ce chimia a devenit un preţios auxiliar al inframicrobiologiei, virusurile au fost supuse variantelor analize pentru a li se studia compoziţia intimă şi a-i diseca astfel pînă la elementele constitutive. Datele acumulate în decursul anilor ne permit astăzi să avem o imagine destul de precisă asupra compoziţiei chimice a diferiţilor inframicrobi studiaţi.

Se ştie astfel că toate virusurile conţin în mod obligator un acid nucleic, ribo- sau dezoxiribonucleic, iar unele chiar pe amîndoi. În general însă mai toţi autorii exclud din definiţiile sau clasificările lor virusurile care conţin ambii acizi nucleici, considerîndu-i o categorie aparte de microorganisme, diferite de virusurile propriu-zise.

Acidul nucleic este cuplat cu o proteină, formînd astfel o nucleoproteină. Acest complex este suficient pentru a forma virusurile simple ca de exemplu virusurile mozaicurilor plantelor, cele poliomielitice sau adenovirusurile. În alte cazuri însă, la acest complex nucleoproteic se adaugă şi alţi compuşi chimici cum ar fi lipidele, hidraţii de carbon etc. Această complexitate chimică, la care se adaugă şi cea morfologică, caracterizează virusurile mari dintre care citäm virusul gripal, herpetic, vaccinal. Toate acestea au o structură internă evidenţiată morfologic prin prezenţa unui „miez" compus din nucleoproteina activă, învelit într-unul sau sau mai multe straturi proteice, sau lipoproteice, ce constituiesc membranele de înveliş.

Acidul ribonucleic reprezintă o parte constitutivă în numeroase virusuri, atît ale plantelor cît şi ale animalelor. Concentraţia lui pe unitate virală variază de la un virus la altul, şi chiar uneori în interiorul populaţiei virale ale unei singure tulpini. Este vorba în acest caz de virusurile numite „incomplete", în care acidul nucleic este pus în evidenţă în cantitate mai redusă faţă de cifra medie obişnuită pentru acea tulpină.

Acidul ribonucleic este prezent într-o gamă variată de proporţii în virusurile animale sau vegetale. Pînă în prezent se pare că virusul mozaicului petelor inelare deţine cantitatea cea mai mare de ARN, deoarece 40% din corpusculul său este ocupat de acesta (Stanley, 1939), în timp ce virusul mozaicului tutunului conţine 6% (Knight şi Stanley, 1941). Dintre virusurile animale, cele poliomielitice prezintă o proporţie de ARN care se cifrează în medie la 30% (Schwerdt şi Schaffer, 1955), iar virusul gripal, cel mai sărac din acest punct de vedere, nu conţine decît 0,74% (Frisch-Niggemeyer şi Hoyle, 1956). Între aceste cifre, care pot fi considerate ca extreme, se situează o gamă largă de virusuri în care ARN este prezent în concentraţii variate.

Rolul acizilor nucleici, în general, şi al ARN în particular, în interiorul corpusculului viral nu era pe deplin precizat pînă în 1956, cînd se aduce

o noţiune nouă în inframicrobiologie şi anume, infectivitatea acizilor nucleici virali.

Cercetările care au condus la aceste concluzii au fost realizate cu ajutorul VMT, virus care conţine ARN. Ca în mai toate marile descoperiri se poate găsi un fir conducător al cărui început se situează cu ani înainte şi este reprezentat de unele cercetări premergătoare. Nici marea descoperire care o constituie precizarea rolului infectant al acizilor nucleici virali nu face excepţie. Astfel, în 1949, Markham şi Smith descoperă că virusul mozaicului napilor supus ultracentrifugării se separă în două componente, dintre care una, aceea care sedimentează mai repede, conţine ARN. Ambele componente inoculate la plantă dau rezultate diametral opuse: cea care conţine ARN este infectantă, în timp ce cealaltă este lipsită de această proprietate. Dacă se repetă experienţa se constată, tot cu ajutorul sedimentării în ultracentrifugă, că din întreaga populaţie virală obţinută din plantele infectate, numai 60% din cantitatea de corpusculi sînt infectanţi şi conţin ARN. Aceste rezultate experimentale justifică concluzia lui Markham (1949) care atrage atenţia, pentru prima dată, asupra rolului acidului nucleic în dirijarea multiplicării virusului. Subliniem că populaţia virală reprezentînd cele 40% de elemente lipsite de infectivitate şi de ARN se încadrează în categoria virusurilor incomplete de care aminteam mai sus.

Takahashi şi Ishii (1953), pe de o parte, şi Jeener şi Lemoine (1953) pe de alta, reuşesc în 1963 să izoleze din frunzele de tutun bolnave de mozaic, o proteină asemănătoare din punct de vedere imunologic şi morfologic cu virusul mozaicului tutunului. Cristalizabilă şi ea, această proteină este însă lipsită de ARN şi în acelaşi timp se dovedeşte a nu fi infectantă pentru frunzele sănătoase. Aceste rezultate aduc încă o dovadă în plus asupra rolului acidului nucleic, de data aceasta cuprins în VMT. Rezulta de asemenea din aceste cercetări că proteina virală, lipsită de acidul nucleic, nu are proprietăţi infectate şi astfel faptele care precizau rolul acizilor nucleici din virusuri se acumulau tot mai multe.

Între timp, Hershey şi Chase (1952) dovediseră cu ajutorul izotopilor marcaţi că numai acidul nucleic al bacteriofagilor pătrunde în interiorul bacteriei sensibile şi că numai el este răspunzător de perturbările profunde suferite de bacterie şi de inducţia noilor fagi. Deşi în acest caz este vorba de un ADN, experienţele acestea tindeau să demonstreze că şi celălalt acid nucleic are un rol hotărîtor în deţinerea şi transmiterea caracterului infectant.

În 1955, Hart (1955) aduce noi date de mare importanţă teoretică şi practică în privinţa rolului ARN viral. Acest autor constată că degradarea cu ajutorul RN-azei a unui fragment terminal din molecula de ARN, cuprinsă încă în VMT parţial denudat cu un detergent, este însoţită de pierderea totală a infectivităţii.

Pe lîngă aceste rezultate, care pot fi considerate directe, deoarece se adresează unei molecule native de ARN, adică aşa cum se găseşte ea

Scanned with OKEN Scanner

cuprinsă în interiorul virusului, cercetări indirecte aduc dovezi suplimentare în aceeaşi problemă.

Astfel, Commoner şi Mercer (1952) obţin suprimarea infectivităţii virusului mozaicului tutunului prin utilizarea tiouracilului, care se încorporează în molecula de ARN în locul uracilului. Rezultate similare sînt observate atunci cînd se utilizează *8*-azaguanina, analog al guaninei, care şi el perturbă sinteza caracteristică ARN (Matthews, 1954). În aceste cazuri, moleculele noi de ARN sintetizate de celulă sînt total lipsite de infectivitatea datorită greşelii survenite în configuraţia moleculară prin substituirea uneia din constituienţii naturali cu analogul său.

Toate aceste rezultate, ca de altfel şi altele înregistrate în literatură, dovedeau în mare măsură rolul activ al ARN în caracterul infectant şi inductiv al virusurilor. Proba definitivă însă nu a fost adusă decît prin experienţele cruciale realizate concomitent în 1956 atît de Gierer şi Schramm la Tübingen cît şi de Fraenkel-Conrat la Berkeley.

Infectivitatea acizilor ribonucleici ai virusurilor plantelor. Primul virus din care s-a reuşit extragerea unui ARN înzestrat cu proprietăţi infectante, a fost virusul mozaicului tutunului. Acest rezultat a fost posibil şi în acelaşi timp mult mai uşor de obţinut, deoarece virusul putea fi izolat fără dificultate în stare pură, chiar cristalizat, după cum descoperise Stanley încă în 1935. Scurt timp după această importantă descoperire, Bawden şi Pirie (1937) reuşesc că demonstreze că virusul cristalizat de Stanley nu are o globulină, cum crezuse acest autor, ci o nucleoproteină în care acidul nucleic este de tip ribonucleic.

Cantitatea mare de virus care se poate izola din frunzele bolnave, proporţia relativ mare de ARN pe care îl conţine, ca şi uşurinţa cu care poate fi purificat, au reprezentat desigur tot atîţia factori care au condiţionat extragerea unui ARN infectant, în primul rînd din VMT. Nu trebuie de asemenea omis faptul că în 1955, Fraenkel-Conrat şi Williams reuşiseră ceea ce în primul moment fusese numit „sinteza" iar ulterior „reconstituirea" virusului mozaicului tutunului. Aceşti autori pun în prezenţă, în anumite condiţii experimentale, ARN extras din VMT şi proteina aceluiaşi virus, ambele inactive luate în parte. Datorită condiţiilor experimentale utilizate de autori, se observă reconstituirea virusului întreg, înzestrat cu toate caracterele sale cunoscute: infectivitate, morfologie, antigenitate.

Pornind de la aceste constatări care deschideau noi drumuri de cercetare în domeniul virusurilor, Gierer şi Schramm (1956 *a*) pe de o parte şi Fraenkel-Conrat (1956) pe de altă parte aduc, aproape în acelaşi timp, prima dovadă experimentală a infectivităţii ARN izolat din VMT. Din experienţele lor reise că ARN extras din virusul complect, cu ajutorul a două tehnici diferite, în absenţa germenilor virali, poate reproduce prin el însuşi infecţia caracteristică a plantei de tutun. În frunzele plantei se pot găsi, după această infecţie de un tip cu totul nou, virusul mozaicu-

lui identic din toate punctele de vedere cu cel din care ARN fusese extras, şi în aceeaşi cantitate ca în cazul în care planta ar fi fost infectată în modul obişnuit.

În tehnica utilizată de Gierer şi Schramm (1956 *a*) se preconizează extragerea ARN din interiorul virusului cu ajutorul unei soluţii saturate de fenol. Manopera comportă trei tratări succesive ale suspensiei virotice cu această soluţie, la temperatură joasă (+ 4°) şi într-un timp relativ lung (50 min).

Inocularea soluţiei de ARN pe frunzele de *Nicotiana glutinosa* arată că 10 μg de acid nucleic produc aproximativ acelaşi efect ca şi inocularea, în aceleaşi condiţii, a 0,2 μg de virus activ, complet. Dacă se raportează aceste cifre la cantitatea de acid nucleic existent în corpusculii virali, se ajunge la cifre cuprinse între 0,1 şi 0,5 care reprezintă procentajul infectivităţii extractului.

În extractele lor, Gierer şi Schramm nu au putut pune în evidenţă prezenţa proteinelor cu ajutorul reacţiei biuretului, ceea ce înseamnă după părerea lor că această substanţă trebuie să fie într-o cantitate inferioară celei de 0,4%. Întrebuinţînd însă tehnica de fixare a complementului, Gierer şi Schramm (1956 *b*) arată că în adevăr în extractele lor se poate pune astfel în evidenţă existenţa unei cantităţi mai mici decît 0,02% de proteină extrasă o dată cu ARN din VMT. Prezenţa acestei infime cantităţi de proteină nu poate justifica, credem noi, infectivitatea soluţiei de ARN, în special din două motive. În primul rînd, cantitatea de 0,2 μg existentă într-un ml de extract este extrem de mică ţinînd seama că inocularea se face cu un volum mai redus decît 1 ml dintr-o diluţie a soluţiei de acid nucleic. Presupunînd că s-ar putea concepe o recombinare între ARN şi proteină, în sensul celei obţinute în anumite condiţii speciale de Fraenkel-Conrat şi Williams (1955), cantitatea de virus complet rezultat din urmele de proteină existente în soluţie ar fi mult sub doza infectantă necesară producerii leziunilor.

Pe de altă parte, Gierer şi Schramm supun extractele lor unor probe de control hotărîtoare, care dovedesc că infectivitatea preparatelor este datorită exclusiv ARN, proteina neavînd nici un rol activ. Tratînd soluţia de ARN cu o cantitate mică de RN-ază (2 μg/ml), autorii au observat că, după un contact de 10 min la + 4°, infectivitatea soluţiei este complet pierdută. În aceleaşi condiţii, virusul complet îşi păstrează intactă întreaga sa activitate. Faptul că enzima are o acţiune specifică asupra substratului, care în acest caz este reprezentat prin ARN viral, dovedeşte că în extractul activ moleculele de ARN sînt cele ce conferă infectivitatea şi nu cei cîţiva corpusculi virali rămaşi nedegradaţi de tratamentul cu fenol, ipoteză susţinută de unii autori. De altfel, supusă ultracentrifugării, soluţia de ARN conservă practic acelaşi grad de infectivitate în lichidul supernatant după 30 min la 50 000 t/m, în timp ce supernatantul suspensiei de virus devine extrem de puţin activ.

Scanned with OKEN Scanner

Tehnica utilizată de Fraenkel-Conrat (1956) în cercetările sale diferă de aceea preconizată de Gierer şi Schramm, dar rezultatele înregistrate sînt superpozabile. În aceste experienţe, Fraenkel-Conrat degradează VMT cu un detergent, dodecil-sulfatul de sodiu. Astfel tratat, virusul eliberează un ARN care ,inoculat pe frunzele de tutun reproduce leziunile caracteristice mozaicului. Extractele acestui autor sînt însă mult mai puţin infectante decît cele obţinute după tratamentul cu fenol, din experienţele lui Gierer şi Schramm. În adevăr, ARN izolat cu detergent prezintă un procent cuprins între 0,007 şi 0,05 din infectivitatea totală a acidului nucleic din tulpina de virus. Reamintim că extractele obţinute cu fenol prezintă valori cuprinse între 0,1 şi 0,5% din infectivitatea totală. Extractele lui Fraenkel-Conrat sînt şi ele lipsite de corpusculi virotici intacţi, deoarece sînt sensibile la acţiunea inactivantă a RN-azei şi insensibile faţă de γ-globulina serului imun antimozaic.

Problema persistenţei corpusculilor virali întregi, nedegradaţi de tratamentul cu fenol sau detergent, a preocupat vreme îndelungată mintea cercetătorilor care nu-şi puteau explica sau nu admiteau că moleculele de ARN pot fi ele însele infectante. Astăzi însă această proprietate este unanim recunoscută şi s-a ajuns la convingerea că un virus îşi datoreşte caracterul său infectant moleculelor de acid nucleic, fie ribo- fie dezoxiribonucleic, pe care le cuprinde. În 1956 însă erau necesare o serie de precauţii experimentale, de martori convingători, pentru a demonstra că soluţia activă este lipsită de elemente virale şi că urmele de proteină rămasă în extract nu-i conferă infectivitatea. Pentru acest motiv, soluţia de ARN era supusă acţiunii RN-azei, a conservării la rece, la cald sau la temperatura laboratorului, se adăuga ser imun specific ori era precipitată cu alcool sau soluţii saline concentrate.

Pentru a ilustra această controversă, vom cita un argument inteligent adus de Tovarniţki (1960) celor care invocau rolul activ al urmelor de proteine în extractele de ARN. Autorul arată că resturile de proteină virotică din unele extracte pot fi uneori în cantitate de 0,2%, aceleaşi extracte prezentînd o infectivitate care se reduce la 1 pînă la 5% din infectivitatea virusului întreg. Dacă se face un calcul comparativ între procentul de proteină şi infectivitatea extractului, pe de o parte, şi aceiaşi factori raportaţi la virusul întreg, pe de altă parte, se observă că în timp ce cantitatea de proteină scade în extract de 5 000 de ori, infectivitatea scade numai de 20—100 de ori. În cazul în care infectivitatea extractului s-ar datora prezenţei proteinei, aceasta înseamnă că „infectivitatea specifică" a proteinei din extract a crescut de 50—250 de ori faţă de virusul iniţial. Se ştie că substanţele chimice utilizate pentru extragerea ARN, şi anume dodecil-sulfatul de sodiu şi mai ales fenolul, determină denaturarea tuturor proteinelor cunoscute, astfel încît şi proteina care ar mai putea persista alături de ARN ar fi, fără îndoială, denaturată. Or, este greu de conceput că o proteină denaturată în loc să-şi piardă activitatea măcar în parte, să reuşească totuşi să şi-o mărească într-o proporţie atît de mare.

Scanned with OKEN Scanner

În acelaşi sens pledează şi demonstraţia experimentală realizată de Agatov (1941 *a*), care arată că în cazul unei proteine virale complet modificate prin blocarea grupelor funcţionale de bază, virusul poate fi multiplicat, ceea ce dovedeşte că proteina VMT nu joacă nici un rol în procesul de multiplicare. De asemenea, acelaşi autor arată că cuplarea la moleculele de proteină pînă la 28 000 de radicali acil, nu determină suprimarea infectivităţii (1941 *b*).

Aceste cercetări dovedesc fără umbră de îndoială rolul activ jucat în exclusivitate de ARN în mecanismul infectivităţii VMT. Rezultă că în absenţa proteinei şi fără a avea nevoie de integritatea corpusculului viral, singur acidul nucleic poate induce în celula sensibilă biosinteza virusului şi determină astfel boala experimentală caracteristică a frunzei de tutun.

După cum am arătat, infectivitatea soluţiei de ARN extras din VMT este mult mai redusă faţă de titrul infectant al virusului întreg. În cazul extracţiei cu fenol, această activitate este de 0,1 pînă la 0,5% din aceea a virusului, în timp ce dodecil-sulfatul de sodiu izolează un produs cu o activitate cuprinsă între 0,05 şi 0,007%. Rezultă în mod evident că extracţia fenolică are faţă de aceea cu detergent un avantaj indiscutabil.

Numeroase ipoteze au avut ca scop explicarea scăderii infectivităţii moleculelor de ARN odată extrase din virus. S-a invocat astfel, acţiunea nucleazelor şi a fosfodiesterazelor asupra moleculei libere, vîrsta plantei, starea sa fiziologică, modul de inoculare, şi chiar absenţa proteinei virale cu rol în diseminarea infecţiei cu virus. De asemenea, s-au luat în considerare traumatismele pe care le poate suferi molecula de ARN în cursul procesului de extracţie: agitaţie, temperatură, pH, forţă ionică, oxidare, influenţa directă a agenţilor de extracţie etc.

Recent o îmbunătăţire a tehnicii de extracţie a fost imaginată de Fraenkel-Conrat şi colab. (1961). Autorul întrebuinţează bentonita ca absorbant al nucleazelor, pe care o adaugă în cursul extracţiei. Prin acest artificiu se obţine un ARN foarte pur, în care proteina lipseşte complet sau în unele cazuri se poate pune în evidenţă prezenţa unui singur lanţ peptidic pentru 25 moli de ARN. Rezultatul acestei experienţe reprezintă o dovadă în plus că infectivitatea produsului extras din VMT este datorită ARN, fără nici o intervenţie a proteinei. Mai mult decît atît, Sarkar (1963) precizează condiţiile optime de extracţie a ARN în prezenţa bentonitei şi arată că astfel se poate obţine un produs de 25 de ori mai activ ceea ce echivalează cu 5% din infectivitatea virusului.

Metodele propuse de diferiţi autori pentru extragerea ARN din VMT se bazează pe înlăturarea proteinei virale cu agenţi chimici sau fizici. Astfel, Cohen şi Stanley (1942) supun suspensia de virus timp de 1 min la temperatura de 100°, într-o soluţie salină. Schramm şi colab. (1955) preconizează degradarea proteinei prin ridicarea pH-ului la 10,3, fie adăugînd direct soluţia alcalină suspensiei virale, fie dializînd aceasta contra primei: operaţia trebuie condusă la 0° pentru evitarea denaturării. De curînd, Fraenkel-Conrat (1957) separă proteina virală de ARN prin

tratare cu acid acetic în concentraţie finală de 67% la temperatură joasă. Ambele metode pot fi întrebuinţate în special pentru obţinerea proteinei virale în stare nativă, în timp ce ARN este parţial denaturat, ceea ce se traduce prin pierderea în mare măsură, sau chiar totală, a infectivităţii. Tehnicile actualmente utilizate pentru extragerea unui ARN nativ, infectant, preconizează denaturarea proteinei virale fie cu fenol, fie cu un detergent, care lasă liber în soluţie moleculele de ARN. Este vorba de metodele întrebuinţate de Gierer şi Schramm şi Fraenkel-Conrat în cercetările lor asupra infectivităţii ARN din VMT. Aceste tehnici şi în special aceea de extracţie cu ajutorul fenolului au fost ulterior aplicate în numeroase laboratoare pentru izolarea acizilor nucleici infectanţi din variate virusuri.

Tehnica de izolare a acizilor nucleici cu fenol comportă de la una la trei extracţii succesive a suspensiei virale cu o soluţie saturată de fenol în apă. După Gierer şi Schramm (1956 *a*) toate operaţiile sînt conduse la +4°, în timp ce Wecker (1959 *a*) ţine rezultate foarte bune făcînd extracţia la +60°. În cursul extracţiei, nucleoproteina virală este scindată în cei doi compuşi chimici, dintre care proteina trece în faza fenolică, în timp ce acidul nucleic, lipsit de proteină, rămîne în faza apoasă. Tratamentele repetate cu fenol nu scad titrul infectant al acidului nucleic. Acesta poate fi precipitat cu alcool şi astfel purificat şi concentrat. Precipitările succesive determină o creştere a infectivităţii, datorită după toate aparenţele înlăturării anumitor substanţe cu rol inhibitor (Cheo şi colab., 1959). Pentru acelaşi motiv, Haschemeyer şi colab. (1959) preconizează executarea extracţiei în prezenţa unui chelator, în speţă EDTA (etilen-diamină-tetraacetat) al cărui rol este de a capta ionii de metale grele a căror acţiune de inactivare a moleculelor de ARN este evidentă (Cheo şi colab., 1959).

Întrebuinţarea unui detergent (dodecil-sulfatul de sodiu) a fost introdusă de Fraenkel-Conrat şi colab. (1955 şi 1957) pentru izolarea ARN nativ din VMT. Metoda constă în tratarea suspensiei virale, în concentraţie de 1%, cu detergent, el însuşi în concentraţie finală de 1%, timp de 5 min la 50°. Şi prin acest tratament complexul nucleoproteic viral este desfăcut, iar proteina denaturată ; acidul nucleic infectant rămîne în soluţie. Preparatul este purificat mai întîi prin precipitarea proteinei cu sulfat de amoniu şi ulterior a acidului nucleic cu alcool.

Acidul ribonucleic poate fi precipitat din soluţie în prezenţa alcoolului în concentraţie de 66%, sau a clorurii de sodiu M. Prin precipitări şi redizolvări succesive, compusul activ poate fi purificat şi în acelaşi timp concentrat. Este cunoscut astăzi faptul că în aceste condiţii sînt precipitate cu predilecţie moleculele înalt polimerizate.

Moleculele de ARN infectant, libere în soluţie, dezvelite de învelişul proteic, sînt foarte labile şi sensibile la factorii externi. Astfel, ele sînt uşor degradate de RN-ază, de schimbările bruşte ale forţei ionice, de conservarea la temperaturi ridicate : în cîteva ore soluţia devine inactivă la 37° sau chiar la temperatura camerei.

Proprietăţile fizico-chimice ale ARN izolat din VMT au format obiectul a numeroase studii, datorită faptului că el a fost primul acid nucleic de acest tip obţinut în stare pură şi în cantităţi relativ mari.

Analizele chimice au arătat că acest ARN nu diferă în linii mari, de compuşii similari existenţi în celule. Astfel compoziţia în baze este următoarea : adenină 1,13 ; guanină 1 ; citozină 0,77 ; uracil 1,11 (Knight, 1954).

Supus ultracentrifugării analitice, ARN din VMT se dovedeşte a nu fi omogen. În adevăr, se poate pune în evidenţă o componentă care are o constantă de sedimentare de 19 *S* la pH 7 şi care constituie 25—75% din cantitatea de ARN. Celelalte componente prezintă o constantă de sedimentare mai mică şi par a fi constituite din molecule degradate. După toate probabilităţile, componenta de 19 *S* reprezintă ARN viral nativ a cărui greutate moleculară calculată după aceste constante este de $2{,}1 \times 10^6$ (Gierer, 1957 ; Boedtker, 1959). Această cifră poate fi calculată pornind de la conţinutul în ARN al VMT şi anume 5,1% (Knight şi Woody, 1958) şi greutatea moleculară a virusului complet, de 39×10^6 (Boedtker, 1959), în care caz se ajunge la cifra de 2×10^6 pentru greutatea moleculară a ARN.

Dacă ARN infectant este supus denaturării termice, şi prin aceasta îşi pierde activitatea, el prezintă în ultracentrifugă o bandă relativ omogenă, cu o constantă de sedimentare de aproximativ $S_{20}=27-30$ (Boedtker, 1959). Acest produs, analizat de Commoner (1958 şi 1959) cu ajutorul vîscozimetriei şi a difuziei luminii, prezintă o greutate moleculară de $1{,}9 \pm 0{,}16 \times 10^6$, ceea ce dovedeşte că pierderea unei cantităţi de 2% din lanţul nucleotidic conduce la suprimarea activităţii infectante.

Ginoza şi Norman (1957) constată, cu ajutorul birefringenţei de scurgere, că bazele purinice şi pirimidinice sînt aşezate paralel cu axul lung al moleculei de ARN, ceea ce îi conferă, conchid autorii, o structură înalt ordonată. Din rezultate obţinute prin studiul cineticei degradării cu RN-ază, Gierer (1958 *a*, *b*, *c*) ajunge la concluzia extrem de importantă că molecula de ARN a VMT este monocatenară. În adevăr, punctul de vedere susţinut de Gierer se bazează pe datele viscozimetrice cînd, datorită tratamentului cu nucleaza specifică, care produce ruperi în molecula cu un singur lanţ, se observă o scădere marcată a viscozităţii soluţiei. Reamintim că acest tratament nu are nici un efect în cazul în care molecula de ARN este dublu spiralată. Această descoperire a fost confirmată de Ginoza (1958 şi 1959), care urmăreşte cinetica denaturării termice a ARN infectant. Mai mult decît atît, din rezultatele sale Ginoza deduce că o singură rupere în legăturile fosfodiesterice din lanţul de 6 500 nucleotide (Hart, 1959) determină inactivarea moleculei. De asemenea, rezultă că bazele sînt aşezate în afara helixului şi nu în interiorul său, ca în cazul moleculei de ADN. Autorul imaginează molecula simplu spiralată a ARN ca un helix aşezat în interiorul virusului şi avînd o rază de 40 Å. Pe fiecare spiră a helixului sînt aşezate cîte 50 de baze orientate paralel cu axul lung al particulei virale ; lungimea totală a helixului este de 33 000 Å. Atomii de fosfor sînt aşezaţi pe spire la distanţe egale de 5Å. Aceste date interesante, care pre-

Scanned with OKEN Scanner

cizează configurația moleculei de ARN a VMT, au fost confirmate în totalitate cu ajutorul studiilor realizate cu ajutorul difracției în raze X (Franklin și Holmes, 1958).

Experiențele de inactivare prin expunerea la raze X au demonstrat că greutatea moleculară radiosensibilă a ARN este de $2,7 \times 10^6$, atît în cazul iradierii virusului întreg cît și a ARN infectant, liber în soluție (Ginoză și Normann, 1957 ; Buzzel și colab., 1956). Acest fapt reprezintă încă o dovadă că numai molecula de ARN cuprinsă în interiorul virusului are rol activ în manifestările caracteristice infecției virale.

Rezultă de asemenea din aceste experiențe că în fiecare element viral există o singură unitate infectantă, adică o singură moleculă de ARN. Pe de altă parte, Lauffer și colab. (1956) observă că, în cazul iradierii cu raze X a virusului complet, greutatea moleculară a ARN scade concomitent cu pierderea activității.

Inactivarea cu RUV a ARN viral, comparativ cu VMT, a arătat comportări diferite în funcție de tulpina de virus. Astfel, în timp ce ARN izolat din tulpina U I este de șase ori mai sensibil decît virusul întreg, compusul extras din tulpina U II are o sensibilitate egală cu aceea a virusului (Siegel și colab., 1956 ; McLaren și Takahashi, 1957). În cazul iradierii frunzelor, perioada de latență ce se scurge din momentul inoculării pînă la apariția primelor simptome suferă modificări apreciabile (Siegel și colab., 1957).

Cercetări asupra acțiunii mutagene a acidului nitros asupra ARN din VMT au fost întreprinse pentru prima dată de Schuster și Schramm (1958) și de Gierer și Mundry (1958). Autorii constată că acidul nitros la pH 4,1-4,3 determină apariția de mutante ale tulpinii de virus studiate, datorite transformărilor produse în unele baze purinice și pirimidinice.

Experiențele de inactivare a virusului cu ajutorul serului imun au dovedit lui Rappaport (1959) că acest mod de inactivare este doar aparent, deoarece ARN extras din virusul astfel tratat era infectant. Acest rezultat dovedește, credem noi, că un virus inactivat cu serul imun omolog nu-și mai poate manifesta proprietățile patogene în interiorul celulei, deoarece învelișul proteic nu poate fi atacat de enzimele proteolitice și în acest caz acidul nucleic nu poate fi eliberat pentru a-și manifesta activitatea ; acest fapt aduce un argument experimental unei ipoteze formulate de unul dintre noi cu cîțiva ani în urmă (Portocală, 1960 *a*). Pe de altă parte, rezultatele lui Rappaport aduc o dovadă în plus asupra rolului major al ARN viral.

Moleculele libere de ARN infectant sînt mult mai sensibile acțiunii inactivante a unor agenți chimici decît virusul complet, datorită rolului protector al învelișului proteic manifestat față de molecula de acid nucleic cuprinsă în virusul intact. S-a constatat de asemenea că atît agenții fizici cît și cei chimici cu rol inactivant asupra virusului au o afinitate cu totul specială față de acizii nucleici, ceea ce dovedește că în realitate aceștia din urmă sînt substanțele cele mai interesate în procesul de inactivare. Este remarcabil de asemenea faptul că agenții inactivanți sau atenuanți — fizici sau chimici — întrebuințați în prepararea vaccinurilor anti-

virale în general, reprezintă noxe care se adresează în special acizilor nucleici cuprinşi în virusul—vaccin pe care îi modifică.

Calea deschisă de rezultatele remarcabile obţinute de Gierer şi Schramm şi de Fraenkel-Conrat a dat posibilitatea teoretică şi mijloacele experimentale practice să se demonstreze că nu numai ARN extras din VMT este înzestrat cu proprietăţi infectante ci şi alte virusuri conţin molecule de ARN activ. Ţinem să precizăm de pe acum că toate încercările de izolare de ARN infectanţi din virusurile plantelor au fost încununate de succes : tehnicile originale ale celor două grupuri de cercetători, de la Tübingen şi de la Berkeley, aplicate ca atare sau cu unele modificări, au permis autorilor să atingă scopul urmărit.

În 1959, Kaper şi Steere (1959 *a*) reuşesc să izoleze un ARN activ din virusul petelor inelare a tutunului. Acest produs, sensibil la acţiunea RN-azei şi a conservării la +4°, prezenta un indice de infectivitate de 0,1 pînă la 1% din întreaga infectivitate a virusului complet. În acelaşi an, aceiaşi autori dovedesc că ARN extras din virusul icterului napilor este activ (Kaper şi Steere, 1959 *b*). De data aceasta însă activitatea produsului este de 0,1 pînă la 0,5% din aceea a virusului, deşi acesta din urmă conţine o cantitate considerabilă de ARN şi anume 35%. Acidul ribonucleic infectant tratat cu spermină şi *3*-aminopropil îşi stabilizează structura secundară, ceea ce îl face să fie parţial rezistent la acţiunea RN-azei sau a temperaturii (Mitra şi Kaesberg, 1963). Legăturile dintre ARN şi proteina virală par a fi destul de slabe, deoarece Montgremier (1963) reuşeşte să izoleze acidul nucleic din virusul complet prin difuzie în geloză sau pe cale electroforetică. Această decomplexare, realizată relativ uşor, a nucleoproteinei virale conduce pe autor la convingerea că legăturile ARN-proteină ar fi de natură electrostatică.

Virusul *tomato bushy stunt*, cel de-al doilea virus care a putut fi cristalizat după VMT, a eliberat şi el sub acţiunea detergentului şi a fenolului un ARN infectant (Rushizky şi Knight, 1959). Indicele de activitate al acestui produs sensibil la acţiunea RN-azei este de 0,1%.

Bawden şi Kelczkowski (1959) extrag cu ajutorul tehnicii lui Gierer şi Schramm un ARN infectant din virusul X al cartofului. Acelaşi produs a fost izolat de Reichmann şi Stace-Smith (1959) utilizînd însă guanidina şi versenul. Acest produs se dovedeşte mai activ decît cel preparat de Bawden.

Diener şi Weaner (1959) atacă virusul petelor inelare necrotice al castravetelui, reuşind să extragă un ARN infectant cu un indice de activitate de 1%. Principiul activ este sensibil la acţiunea nucleazei şi la conservarea la gheţar.

Din virusul mozaicului castravetelui, întreţinut pe frunzele de tutun, Welkie (1959) obţine prin extracţie fenolică un ARN cu un indice de activitate remarcabil, deoarece el reprezintă 5% din infectivitatea totală a virusului complet. Rezultate similare înregistrează şi Schlegel (1960) cu acelaşi virus.

Scanned with OKEN Scanner

În general, asupra tuturor ARN infectanți izolați din virusurile plantelor s-au realizat numeroase cercetări biologice și fizico—chimice. Rezultatele lor sînt cu atît mai prețioase cu cît acești compuși au putut fi obținuți în stare relativ pură și în cantități relativ mari, deoarece virusurile plantelor se izolează într-o proporție mare din planta bolnavă și pot fi purificate cu multă ușurință.

De la primele rezultate comunicate de Gierer și Schramm, confirmate și amplificate de numeroși cercetători, a reieșit în modul cel mai evident că un virus își datorește caracterele sale infectante și inductive, față de celula sensibilă, exclusiv acidului nucleic pe care îl cuprinde. Lucrările ulterioare realizate cu alte virusuri fitopatogene au întărit acest punct de vedere și au deschis drumuri noi de cercetare dînd argumente valoroase în interpretarea proceselor patogene virale. Pe unul din aceste drumuri s-au angajat oamenii de știință care au abordat studiul rolului infectant al acizilor nucleici izolați din virusurile animale.

Infectivitatea acizilor ribonucleici ai virusurilor animale. După un interval de timp ce nu depășea un an de la apariția lucrărilor lui Gierer și Schramm și a lui Fraenkel-Conrat, prin care se anunța izolarea unui ARN infectant extras dintr-un virus al plantelor, metoda cu fenol a permis obținerea unor compuși similari, de data aceasta din virusuri ale animalelor. Aceste remarcabile rezultate au fost înregistrate în 1957 de Colter și colab. lucrînd cu virusurile West Nil, Mengo și Polio II. În același an, Wecker și Schäfer eliberează ARN infectant din virusul encefalomielitei ecvine de est (E.E.E.).

Este de subliniat că, cel puțin în cursul primelor cercetări asupra virusurilor animale, tehnica de extracție este aproape identică cu aceea a lui Gierer și Schramm, iar izolarea acidului ribonucleic infectant a fost făcută din țesuturi infectate cu virusul studiat. În anii care au urmat acestor prime descoperiri, autorii au adus unele modificări tehnicii originale adaptînd-o la scopul urmărit, în funcție de țesutul și virusul atacat. În același timp au fost înregistrate și primele rezultate obținute cu virusuri purificate din care s-a reușit să se extragă compusul activ.

După cum arătam, primele încercări reușite de izolare a unor ARN infectanți au fost întreprinse cu ajutorul țesuturilor infectate experimental. Astfel, Colter și colab. (1957 *a*, *b*) utilizează, ca sursă de extracție pentru virusurile Mengo și West Nil, celulele carcinomului ascitic Ehrlich în care virusurile au fost cultivate, iar pentru Polio II sistemul nervos central al hamsterului sugar inoculat experimental. Țesuturile infectante sînt suspendate prin mojarare într-o soluție salină care conține 0,14 M NaCl și 0,01 M citrat de sodiu la pH 7. Supernatantul obținut după o centrifugare lentă este supus tratamentului cu fenol. Pentru aceasta se adaugă un volum egal de soluție apoasă saturată cu fenol și se agită energic, la rece. Fazele se separă prin centrifugare; extracția se repetă încă de două ori în aceleași condiții. Lichidul rezultat inoculat animalelor sensibile le

conferea boala caracteristică. Indicele de infectivitate al produsului a fost de 0,1% din activitatea virusului care a servit la extracţie. Datele înregistrate de Colter şi colab. (1957 *a*) asupra infectivităţii ARN extras din virusul Mengo, au fost sintetizate de autori într-un tabel pe care îl reproducem (tabelul 19).

Tabelul 19

Infectivitatea virusului encefalitei Mengo şi a acidului ribonucleic extras din el (după Colter şi colab., 1957 *a*)

Ore de la infectarea cu Mengo	log LD_{50}	
	Virus	ARN
48	6,6	2,5
48	5,5	2,5
48	4,5	1,6
52	4,5	1,4
56	5,4	2,4
64	5,8	2,5
60	5,5	2,5
64	5,8	2,5
68	6,2	2,5
72	6,2	2,8

În tabelul 20, reprodus după Colter şi colab. (1957 *b*), sînt sintetizate datele referitoare la infectivitatea virusurilor polio şi West Nil şi al ARN extras din ele.

Tabelul 20

Infectivitatea virusurilor West Nil şi poliomielitic şi ale acizilor ribonucleici extraşi din ele (după Colter şi colab., 1957 *b*)

Virusul	log LD_{50}	
	Virus	ARN
Poliomielitic	5,5	2,0
	6,4	2,3
	6,4	2,4
	5,8	2,2
West Nil	5,4	2,5
	5,4	2,6
	5,5	2,4
	5,0	2,5

Ca şi în cazul dovedirii infectivităţii ARN extras din virusurile plantelor, în cazul virusurilor animale autorii au supus produsul activ unor probe de control. Astfel, abolirea infectivităţii după depolimerizarea cu

ajutorul RN-azei (10 μg/ml, 15 min 20°C), constituie o dovadă majoră că originea activităţii extractului se găseşte în moleculele intacte de ARN. Colter şi colab. introduc în plus ultracentrifugarea care respectă infectivitatea, deoarece moleculele active nu sînt sedimentate în condiţiile obişnuite. Este ştiut că ARN precipită în prezenţa clorurii de sodiu în soluţie molară, ceea ce face ca precipitatul astfel obţinut să conţină întreaga activitate a extractului. Conservarea timp de 6 ore la 37° determină, ca şi RN-aza, o depolimerizare a moleculelor de ARN cu pierderea consecutivă a infectivităţii.

Rezultatele înregistrate după aplicarea acestor probe de control dovedesc că, şi în cazul virusurilor animale studiate, rolul exclusiv în transmiterea caracterului infectant îl joacă ARN. Faptul că RN-aza nu are acţiune asupra virusului întreg dar este activă faţă de acidul nucleic arată că învelişul proteic al virusului protejează molecula de ARN de acţiunea depolimerizantă şi inactivantă a enzimei. Nu acelaşi lucru însă se petrece atunci cînd această moleculă se află liberă în soluţie, în contact direct cu nucleaza care, în aceste condiţii îşi poate manifesta activitatea specifică.

În tabelul 21 sînt sintetizate rezultatele obţinute în urma utilizării probelor de control amintite.

Tabelul 21

Comparaţie între virusul poliomielitic şi acidul ribonucleic izolat din acesta (simplificat după Colter şi colab., 1957 *b*)

Proba	log LD_{50}	
	Virus	ARN
Control	5,5	2,4
După RN-ază	5,5	—
După 6 ore la 37°	5,0	—
Control	6,4	2,3
După 1 M NaCl	3,5	3,0
Control	6,0	2,2
După centrifugare (4 ml vîrf)	4,3	2,2
După centrifugare (4 ml mijloc) (30 000 t/m, 60 min)	5,0	2,5

Virusurile obţinute după inocularea ARN în creierul şoarecilor au fost identificate cu ajutorul serurilor imune specifice şi în toate cazurile aceste virusuri erau identice din punct de vedere antigenic cu cele din care acidul nucleic fusese extras, ceea ce dovedeşte specificitatea acidului nucleic.

Scanned with OKEN Scanner

Virusul encefalomielitei ecvine de est (E.E.E.) a eliberat, sub acţiunea fenolului, un ARN infectant, după cum reiese din cercetările lui Wecker şi Schäfer (1957). Pentru a obţine însă acest rezultat autorii au fost obligaţi să aducă unele modificări tehnicii originale preconizată de Gierer şi Schramm. După îngheţarea rapidă a substanţei nervoase şi resuspendarea într-o soluţie izotonică la pH 7, acidul nucleic era extras cu o soluţie saturată de fenol adăugată în proporţie de 2 ml pentru fiecare creier de şoarece utilizat. Extractul astfel preparat era încercat din punctul de vedere al infectivităţii prin inoculare în creierul de şoarece sau în oul embrionat. Numai în aceste condiţii se obţinea moartea animalelor şi infectarea ouălor. Virusul generat astfel era identic cu virusul original.

Ca şi în experienţele lui Colter, Wecker şi Schäfer dovedesc că produsul este infectant datorită ARN şi nu unor particule virale intacte, rămase ca atare după extracţia fenolică. Pe lîngă probe cu RN-ază, care şi în acest caz provoacă pierderea infectivităţii ca şi conservarea la 37° timp de 4,5 ore, ultimii autori introduc proba precipitării cu alcool. Atunci cînd se tratează comparativ suspensia de virus şi ARN extras din acesta cu alcool se obţin două rezultate diametral opuse. În adevăr, în timp ce în aceste condiţii virusul îşi pierde în totalitate infectivitatea, ARN şi-o păstrează intactă. Această constatare reprezintă încă un argument în favoarea lipsei oricărei urme de virus intact în extractul activ, virus care i-ar conferi activitatea.

Ulterior, Wecker (1959 *b*) reuşeşte să extragă un ARN infectant din embrionii de găină infectaţi cu virusul E.E.E. Extractul obţinut conţinea ambii acizi nucleici (40% ADN şi 60% ARN) şi hidraţi de carbon înalt polimerizaţi, însă neidentificaţi. De asemenea, extractul mai conţinea acizi aminaţi şi molecule mici de peptide care dădeau reacţia biuretului. Prin precipitare cu alcool, se poate izola un ARN infectant, care reprezintă la ultracentrifugare două maxime distincte, unul de 24 *S* şi celălalt de 16 *S*. Pe de altă parte, prin aceeaşi metodă se poate pune în evidenţă şi fracţiunea care conţine ADN, dar care dispare după tratare cu DN-ază.

Probele de control realizate cu extractul activ, au arătat că infectivitatea dispare după tratare cu RN-ază sau conservarea la 37°; precipitarea cu alcool determină antrenarea întregii activităţi în precipitat în timp ce virusul supus acestui tratament este total inactivat.

Alexander şi colab. (1958 *a,b*) pun în evidenţă infectivitatea ARN extraşi din virusurile poliomielitice de tip I şi II. Produsele obţinute prin extracţie fenolică sînt testate pe culturi celulare, în care provoacă un efect citopatic caracteristic. Virusurile sintetizate de celule sub influenţa ARN sînt identificate prin reacţii serologice şi se dovedesc a fi identice cu virusurile de origine. Efectul citopatic este complet inhibat de acţiunea RN-azei (100μg/ml), dar nu este influenţat de acţiunea DN-azei, ceea ce identifică totodată produsul, pe lîngă faptul că demonstrează absenţa corpusculilor virali intacţi. Autorii utilizează încă o probă de control, care dă însă

un rezultat paradoxal : produsul activ este inhibat de serul de maimuță, fie că este normal, fie imun. Este demn de remarcat că astăzi această probă este abandonată tocmai datorită rezultatelor neconcordante ; ele se datoresc prezenței constante a RN-azei în serul animalelor sau a omului, indiferent dacă aceștia au fost imunizați contra unui virus sau nu.

În legătură cu greutatea moleculară a virusului poliomielitic (MEF-1), Schwerdet (1957) calculează această valoare și găsește că ea este de $6{,}8 \times 10^6$. Acest virus conține 25-30% ARN, ceea ce permite să se calculeze și greutatea moleculară a unei singure molecule a acestui compus care este egală cu $1{,}7-2{,}04 \times 10^6$. Această cifră este în concordanță cu greutatea moleculară a ARN infectant extras din virusurile Mengo, polio și West Nil, la care s-a găsit $1{,}5-2 \times 10^6$.

Ca și în cazul VMT, la care s-a dovedit că proteina virală nu joacă rolul precumpănitor în infecție, aceasta fiind atributul acidului nucleic, în cazul virusului poliomielitic — de data aceasta un virus animal — cercetările lui McLaren și colab. (1957, 1959, 1964) tind să precizeze același fapt. Din aceste cercetări rezultă că ARN extras în stare nativă cu ajutorul fenolului din unele enterovirusuri nu are nevoie de învelișul proteic pentru a pătrunde în celulă și a iniția infecția. Pe de altă parte, s-a putut dovedi că acest acid nucleic poate pătrunde și în unele tipuri de celule în care virusul întreg nu o poate face ; poate determina astfel infecția în celule considerate ca nereceptive. Se poate deci deduce că „specificitatea" trebuie considerată în strictă dependență de învelișul proteic, care condiționează sau nu afinitatea față de un anumit sistem celular. Ceea ce este de asemenea important este că virusul eliberat de celulele infectate în aceste condiții este identic cu cel inițial și, chiar mai mult, ARN este identic cu cel cu care a fost infectată celula. Concluzia care rezultă este că celula, chiar considerată „insensibilă" la acțiunea virusului întreg, poate totuși sintetiza un ARN identic cu cel inoculat, compus care constituie modelul de sinteză. Rezultate tot atît de interesante au fost obținute și de Somer și colab. (1962), care reușesc să infecteze celulele alantoidiene ale embrionului de găină cu ARN extras din virusul poliomielitic, virus pentru care aceste celule sînt în mod obișnuit insensibile. Faptul că acidul nucleic este dezvelit de învelișul proteic pare să-i crească posibilitatea de pătrundere în alte celule decît cele obișnuit sensibile pentru virusul întreg. Rezultă în modul cel mai evident că specificitatea de tip celular este determinată de proteina virală, în timp ce molecula de ARN este lipsită de acest caracter particular de specificitate.

Inactivarea virusului poliomielitic cu ajutorul unor agenți fizici și chimici (raze ultraviolete, căldură, formol, beta-propiolactonă) a dat posibilitatea lui Prinzie și colab. (1960) să constate că, în realitate, acidul nucleic suferă un proces de inactivare ireversibilă. Se deduce de aici că agenții inactivanți se adresează cu preponderanță ARN pe care îl alterează. Spre deosebire de acest rezultat, inactivarea virusului cu fenol sau cu serul imun specific permite autorilor să extragă un ARN, care are întregul

Scanned with OKEN Scanner

potenţial infectant păstrat nealterat. În adevăr, ultimii agenţi menţionaţi se fixează pe proteina de înveliş pe care o alterează (cazul fenolului) sau o blochează (anticorpii) lăsînd intactă molecula activă de ARN.

Din punctul de vedere al comportării în analiza cromatografică pe coloană, ARN extras din virusul poliomielitic se prezintă ca molecule cu greutatea moleculară mare.

Influenţa molarităţii soluţiei în care se află moleculele de ARN infectant în momentul inoculării are o deosebită importanţă, după cum rezultă din experienţele lui Sprunt şi colab. (1959, 1960 1961 *a*,*b*). Astfel s-a putut constata că soluţiile cu molaritate crescută cresc eficacitatea acidului nucleic faţă de celula sensibilă, datorită probabil pe de o parte ordonării moleculei active, iar pe de alta acţiunii de permeabilitate celulară. La rezultate similare ajung şi Nakamura şi Ueno (1964), care lucrează cu ARN extras din virusul encefalitei japoneze B şi observă că infectivitatea produsului este mult crescută în prezenţa unor soluţii de EDTA (0,01%) şi Na_2SO_4 (1M).

Tot astfel cum cercetările realizate cu ajutorul ARN extras din VMT au servit ca model unei pleiade de experimentatori care au izolat ARN din numeroase virusuri ale plantelor, rezultatele multiple înregistrate cu ARN al virusului poliomielitic au fost la baza unor cercetări care au dovedit caracterul infectant al acestui compus, izolat din numeroase virusuri animale. Descrierea şi comentarea lucrărilor realizate ar depăşi cu mult cadrul acestei monografii al cărui specific este studiul ARN şi nu mecanismul infectivităţii ARN şi consecinţele modificărilor celulare ce decurg din această proprietate. Cu atît mai mult nu ne vom extinde asupra acelor lucrări în care numai uneori se analizează proprietăţile moleculei infectante de ARN. Ceea ce vrem să subliniem însă este faptul că din toate aceste rezultate se degaje concluzia că virusurile studiate îşi datoresc caracterul infectant exclusiv ARN care poate transmite mesajul singur, în absenţa oricărei proteine virale.

Atît virusul poliomielitic, cît şi celelalte virusuri de care aminteam şi care aparţin virusurilor animale, din care s-a reuşit să se extragă un ARN infectant, ca şi virusurile plantelor discutate în prima parte a acestui capitol, sînt virusuri mici, mai simple din punct de vedere structural, mai simple din punct de vedere chimic. Ele se încadrează în categoria definită de Tovarniţki (1950) prin denumirea de „virusuri nucleoproteice". Există însă o altă categorie de virusuri, de care am amintit la începutul acestui capitol cu ocazia clasificării inframicrobilor, virusuri mult mai complexe din punct de vedere structural şi chimic, cu elemente virale de dimensiuni mari. Aceste virusuri conţin în afară de acid nucleic şi proteină, glucide, lipide, apă. Unele din ele, cum este cazul mixovirusurilor, au o membrană limitată lipoproteică, pe care se pune în evidenţă o mucoproteină cu caractere enzimatice. Categoria aceasta cuprinde virusurile pe care Tovarniţki le denumeşte „liponucleoproteice".

Cînd, în 1957, am început — în Institutul de inframicrobiologie al Academiei R.P.R. — seria de cercetări care aveau ca scop studiul acizilor

nucleici infectanți virali, patru virusuri animale : West Nil, Mengo, poliomielita (Colter și colab., 1957 *b*) și encefalomielita ecvină de est (Wecker și Schäfer, 1957), dovediseră că posedă un ARN activ, eliberabil sub acțiunea fenolului.

De compoziție simplă, nucleoproteică, aceste virusuri cuprind un ARN infectant care determină celula sensibilă să sintetizeze un virus complet, similar celui din care compusul activ a fost extras. Concluzia logică, generată de rezultatele înregistrate cu ARN al VMT se poate extinde și în cazul acestor virusuri ; infectivitatea virusului este asigurată de acidul său nucleic, multiplicarea corpusculilor virali nu se realizează prin diviziunea binară a acestora, ci celula sensibilă sintetizează în întregime virusul, pornind de la un model simplu și unic, molecula de ARN viral.

Aceste rezultate confirmau punctul nostru de vedere, susținut de vreme îndelungată, și ne întăreau convingerea asupra unei modalități speciale de multiplicare a virusurilor, diferită fundamental de aceea a bacteriilor, cu un caracter cu totul nou.

În 1957 se situează primele noastre încercări, care aveau să dovedească că și virusurile complexe din punct de vedere chimic și structural sînt infectate prin acidul lor nucleic. Prima lucrare din această serie a format obiectul unei comunicări prezentată în 1958 (Portocală, Boeru și Samuel, 1959 *a*). Aceste cercetări arătau că ARN extras din virusul gripal, virus mare și cu structură complexă, poate induce, prin prezența sa în celulă, sinteza virusului complet.

Analizele chimice au arătat că virusul gripal conține :
ARN — 0,8%—1% (Ada și Perry, 1954 ; Frisch-Niggemeyer și Hoyle, 1956), proteine — 60% — 70% (Frisch-Niggemeyer și Hoyle, 1956 ; Knight, 1947), lipide — 25% (Zillig și colab., 1955 ; Frisch-Niggemeyer și Hoyle, 1956), hidrați de carbon — 3% — 8% (Frisch-Niggemeyer și Hoyle, 1956 ; Ada și Gottschalk 1956). Cînd particula virală este hidratată, ea conține aproximativ 50% apă (Lauffer și Bendet, 1954). Hidrolizat, acidul nucleic al virusului gripal a dovedit că este compus din cele patru baze caracteristice acestui tip de acid : uracilul, citozina, guanina, adenina. Proporția lor variază în funcție de tipul de virus gripal și de tulpina studiată. Dăm cu titlu de exemplu tabelul 22, în care am rezumat unele date, asupra acestui subiect (după Schäfer, 1959).

Pentru comparație, reproducem în tabelul 23 sintetizat de Schaffer (1962), rezultatele analizelor cromatografice ale hidrolizatelor ARN extrași din mai multe virusuri.

Cercetări recente realizate cu ajutorul microscopului electronic cu înaltă rezoluție și cu o tehnică de colorare specială au pus în evidență structura intimă a virusului gripal. Cu această ocazie s-a constatat că fiecare corpuscul viral posedă pe suprafața sa numeroase prelungiri filiforme scurte, care sînt interpretate de autori ca molecule de hemaglutinină (Horne și colab., 1960). În interiorul corpusculului se pune în evidență un lung filament înfășurat, care este constituit din nucleoproteina speci-

fică, virală. Aceasta poate fi extrasă şi examinată în condiţii optime după distrugerea membranei de înveliş cu ajutorul eterului (Hoyle şi colab., 1961).

Tabelul 22

Proporţia bazelor acizilor nucleici ai virusului gripal
(simplificat după Schäfer, 1959)

Tulpina de virus gripal	Bazele (moli/100 moli)			
	Adenina	Guanina	Citozina	Uracilul
A (PR8)	23,1	20,1	24,0	32,8
A (MEL)	23,0	19,7	25,3	32,0
A (WSE)	22,6	20,3	24,1	33,2
A (Swine)	22,7	20,4	24,5	32,4
A (CAM)	22,7	19,3	24,5	33,5
B (LEE)	23,0	18,3	23,1	35,6
B (MIL)	22,8	17,5	23,7	36,0
B (ROB)	22,5	18,6	23,4	35,3

Tabelul 23

Compoziţia bazelor din ARN ale unor virusuri animale (după Schaffer 1962)

Virusul	G	A	C	U
Gripal A	18—20	22—25	24—25	30—33
Gripal B	17—18	21—23	23—24	36—38
Sarcom Rous	21	30	30	19
Polio (3 tipuri)	24	29	22	25
Coxsackie A-9	28	27	20	25
,, A-10	28	28	21	23
,, B-1	24	29	23	24

Este interesant de reamintit aici, pentru cele ce urmează, că virusul gripal a fost supus tratamentului cu eter pentru a înlătura lipidele şi a extrage antigenul G, încă din 1952 de Hoyle şi în 1954 de Schäfer şi Zillig. Tratamentul, care este realizat de aceşti autori într-un interval de timp îndelungat, determină delipidarea virusului, eliberarea antigenului G care conţine întreaga cantitate de ARN din corpuscul şi anume 5,3% (Frisch-Niggemeyer şi Hoyle, 1956), dar care, fapt extrem de important, inactivează virusul, după cum constată chiar Hoyle (1952) şi ulterior Schäfer şi Zillig (1954). Cu această ocazie, Holye (1952) arată de asemenea că virusul gripal este delimitat de o membrană de compoziţie lipoproteică, care după toate aparenţele este dată de celula-gazdă.

În 1957, cînd am început cercetările noastre asupra infectivităţii ARN extraşi din virusurile mari şi în primul rînd din virusul gripal, cu-

noşteam toate aceste date experimentale. Cunoşteam procentul ridicat al proteinei virale şi al lipidelor, cu rol protector faţă de ARN, prezent într-o proporţie atît de mică. De asemenea ştiam că eterul delipidează virusul, dar îi şi suprimă complet infectivitatea. Pe de altă parte, aveam la îndemînă metoda pusă la punct de Gierer şi Schramm pentru obţinerea unui ARN nativ, cu ajutorul căreia se dovedise infectivitatea cîtorva ARN virali.

Prin combinarea delipidării cu eter, realizată însă la temperatură joasă în într-un interval de timp scurt, cu deproteinizarea cu fenol, am pus la punct o nouă metodă cu ajutorul căreia am extras, pentru prima dată, un ARN infectant din virusul gripal (Portocală, Boeru şi Samuel, 1959 *a*). Metoda noastră este astăzi utilizată de cercetătorii care extrag ARN din virusul gripal fie pentru a-i studia proprietatea infectantă, fie pentru analizarea constantelor fizico-chimice (Sokol şi colab. 1959, 1963, 1964; Maassab, 1963; Jumatov şi Isaeeva 1963; Orlova şi Diskina, 1963; Poliac şi Dubrovina, 1963).

Din primele încercări am reuşit, cu ajutorul noii tehnici, să izolăm din virusul gripal purificat un ARN care inoculat în oul embrionat de găină induce sinteza virusului omolog (Portocală, Boeru şi Samuel, 1959 *b*, *c*). Cercetările noastre au precizat natura şi caracterele ARN extras din virusul gripal, precum şi pe acelea ale virusului sintetizat sub acţiunea acestui compus. Acidul nucleic activ a fost întotdeauna extras cu ajutorul soluţiei saturate de fenol, după delipidarea virusului cu eter. Toate operaţiile sînt realizate la temperatură joasă (între 0° şi +4°) şi într-un timp cît mai scurt. Virusul gripal supus extracţiei a fost întodeauna, în cercetările noastre, în prealabil purificat şi concentrat. Soluţiile de ARN obţinute erau imediat inoculate în cavitatea alantoidiană a oului embrionat de găină, în cantitate variabilă, în funcţie de tulpina de virus utilizată, de concentraţia virusului şi de concentraţia ARN prezent în extractul obţinut. Inocularea acidului nucleic infectant determină sinteza abundentă, în general, a virusului gripal, confirmată prin titrurile hemaglutinante ridicate, fie chiar din primul pasaj, fie în trecerile următoare. Uneori, un număr de ouă inoculate cu ARN dau în aparenţă o cultură negativă, care însă în treceri oarbe produc o cultură abundentă de virus. Este posibil ca în acest caz să avem de a face cu doze de ARN la limita inferioară a activităţii sale, care determină sinteza unui număr redus de corpusculi, insuficienţi pentru a determina aglutinarea hematiilor, însă suficientă pentru a produce infectarea ouălor de pasaj (Portocală, Boeru şi Samuel, 1960 *a*). Ugoleva şi colab. (1964) semnalează un fenomen asemănător atunci cînd lucrează cu ARN extras din virusul Sendai. Autorii constată că în peste 80% din încercările de infectare a ouălor embrionate cu acest produs nu se poate obţine o cultură a virusului Sendai din prima inoculare. Este nevoie pentru a obţine un rezultat pozitiv să se facă treceri oarbe, în unul sau două pasaje. Explicarea acestui fapt pare să coincidă cu aceea dată de noi, în cazul inoculării ARN din virusul gripal.

Scanned with OKEN Scanner

Trebuie să remarcăm faptul că și în cazul ARN extras din virusul gripal infectivitatea produsului este mult scăzută față de aceea a tulpinii de virus care a servit la extracție. În adevăr, diluarea produsului chiar la 10^{-1} determină pierderea completă a activității, cu toate că aceeași soluție de ARN, nediluată, produce infecția caracteristică într-un procent de 60%. Scăderea comparativă a activității față de virusul complet poate fi atribuită, după părerea noastră, unor cauze multiple. Într-o lucrare mai recentă, Protocală și Samuel (1964) analizează aceste cauze care trebuie legate de tulpina utilizată, de factorii de extracție, de modul în care se inoculează produsul etc. Astfel, extragerea unui ARN infectant din virusul gripal depinde de virulența tulpinii, care la rîndul ei este legată de numărul de pasaje realizate în laborator după izolare, precum și de tipul tulpinii. Încă din primele noastre cercetări am semnalat că tulpinile de virus gripal întreținute prin numeroase treceri pe oul embrionat dau rezultate inconstante, în timp ce tulpinile recent izolate eliberează un ARN mult mai activ (Portocală, Boeru și Samuel, 1959 *d*). Pe de altă parte, tipul antigenic al tulpinii are un rol important în obținerea unui produs activ. În cercetările noastre, tulpinile de virus gripal de tip A au fost cele care au dat un ARN infectant, în timp ce tulpinile care aparțineau tipului serologic A_2 sau B au eliberat întotdeauna un produs inactiv (Protocală, Boeru și Samuel, 1959 *e*).

Cercetările întreprinse cu ajutorul microscopului electronic credem că ne-au adus explicația lipsei de infectivitate a ARN obținut din tulpina de tip A_2 utilizată de noi. Aceste rezultate morfologice dovedesc că tulpina studiată de noi este compusă dintr-o populație virală care cuprinde peste 50% corpusculi turtiți, inelari, cu conturul puternic deprimat, pe care i-am interpretat ca forme incomplete ale virusului gripal (Portocală și colab., 1959 *f*, *g*). Din cercetările întreprinse de Ada (1957), se știe că formele incomplete ale virusului gripal sînt mai sărace în ARN decît formele obișnuite, complete; primele conțin o cantitate de ARN ce nu depășește 0,3%, în timp ce virusul complet conține 0,8—1%.

Cantitatea foarte redusă de ARN cuprins în virusul gripal, chiar sub forma lui completă, poate la rîndul ei să reprezinte o cauză a infectivității scăzute a extractelor și a pierderii complete a acesteia în cazul diluției peste 10^{-1}. Este de notat că virusul gripal este pînă în momentul de față cel mai sărac în ARN din toate virusurile cunoscute.

Scăderea activității ARN poate fi datorită de asemenea resturilor de RN-ază care, depolimerizînd moleculele active, le face să-și piardă infectivitatea. Pentru acest lucru, unii autori au preconizat extracția în prezența bentonitei sau a inhibitorilor specifici ai nucleazei. Nu trebuie uitat în același timp că în soluția de ARN mai pot persista ioni ai metalelor grele, cu rol evident inactivant; adăugarea unei cantități de EDTA în timpul extracției are ca rol chelarea acestor ioni. Încă din primele noastre publicații am arătat rolul hotărîtor al substanțelor chimice care intră în procesul de extracție; printre acestea eterul și fenolul sînt adesea impurificați, ceea ce determină obținerea unui ARN lipsit de activitate (Portocală și colab., 1960 *b*).

Scanned with OKEN Scanner

Distilarea acestor produse de două ori chiar în ziua în care se face extracţia elimină substanţele oxidante şi în acelaşi timp ionii metalelor grele, substanţe inactivante (Protocală şi Andreescu, 1961).

Inocularea ARN în cavitatea alantoidiană a oului embrionat reprezintă de asemenea o cauză posibilă a scăderii activităţii produsului. În adevăr, pe lîngă faptul că inoculul se diluează extrem de mult în lichidul alantoidian, acesta, ca şi embrionul, conţine cantităţi apreciabile de RN-ază. Într-o lucrare realizată în scopul testării acestei nucleaze în oul embrionat (Portocală, Boeru şi Samuel, 1961), am putut arăta că RN-aza este prezentă atît în lichidul alantoidian, cît şi, mai ales, într-o concentraţie mai mare, în celulele membranei corioalantoidiene; or, virusul gripal este sintetizat de aceste celule, după ce acidul nucleic pătrunde în acestea şi induce sinteza specifică. Rezultatele înregistrate au arătat că RN-aza prezintă variaţii legate de vîrsta embrionului şi anume cifrele maxime sînt găsite în ziua 10-11 în timp ce minimele sînt în ziua 13-14 de incubare a embrionului. Aceste date dovedesc că perioada optimă de inoculare a oului cu ARN infectant este situată în zilele 10-11 de incubare a embrionului în care cantitatea de enzimă este minimă.

Acidul ribonucleic extras după tehnica preconizată de noi (Portocală, Boeru şi Samuel, 1959 *a*) din virusul gripal purificat a fost supus unor probe de control al căror rol era de a dovedi absenţa corpusculilor virali intacţi şi astfel de a arăta în consecinţă că întreaga activitate a produsului este datorită acidului nucleic.

Soluţiile active de ARN conservate timp de 2 ore la 37° îşi pierd activitatea, ceea ce se observă şi după o păstrare la temperatura camerei timp de 24 de ore. În aceste condiţii, suspensia de virus îşi păstrează intactă întreaga sa activitate. Proba depolimerizării cu ajutorul RN-azei a dovedit, şi în cazul ARN gripal, că acesta este sensibil la acţiunea enzimei, pierzînd complet orice infectivitate. Virusul supus acestui tratament rămîne infectant datorită învelişului proteic care apără molecula activă de ARN pe care o cuprinde de acţiunea degradantă a enzimei. Dăm în tabelul 24 sintetic rezultatele înregistrate după supunerea soluţiei de ARN probelor de control amintite.

O dovadă indirectă a absenţei corpusculilor virali din soluţiile de ARN este şi lipsa caracterului hemaglutinant al acestor soluţii. Este cunoscut faptul că virusul gripal determină aglutinarea globulelor roşii datorită unor molecule de natură mucoproteică, care sînt situate pe suprafaţa membranei virale. Această substanţă, hemaglutinina, este denaturată în cursul extracţiei, după toate probabilităţile o dată cu delipidarea virusului, adică în prima operaţie, premergătoare tratării cu soluţia fenolică. În orice caz hemaglutinina, care după cum am amintit este o mucoproteină, nu mai poate persista în soluţia activă de ARN pusă în prezenţa fenolului. Astfel se explică faptul că extractele active ale virusului gripal nu mai sînt hemaglutinante, spre deosebire de virusul sintetizat în prima trecere, sub acţiunea

ARN, virus care îşi manifestă toate proprietăţile caracteristice, inclusiv hemaglutinarea.

Este de remarcat că dovedirea infectivităţii ARN din virusurile plantelor şi animalelor, atît în cazul virusurilor mici cît şi al celor mari, a suscitat

Tabelul 24

Acţiunea unor probe de control faţă de virusul gripal şi de ARN extras (după Samuel, 1955)

Proba de control	Titrul HA al L.C.A. al ouălor inoculate cu :	
	Virus	ARN
Martor	1/2 560	1/1 280
2 ore la 37°	1/2 560	0
$3^{1/2}$ ore la 37°	1/1 280	0
24 ore la 20°	1/1 280	0
RN-ază (20 min la 37°)	1/1 280	0
RN-ază (20 min la 4°)	1/1 280	0

nenumărate suspiciuni. Printre primele îndoieli pe care cercetătorii le întîlneau era argumentul că extractele active mai conţin corpusculi virali intacţi nedegradaţi şi că lor li se datoreşte activitatea produsului. Probele de control efectuate de toţi cercetătorii au dovedit inexistenţa acestor presupuşi corpusculi intacţi. Faptul că soluţia de ARN îşi pierde infectivitatea cînd este supusă unor probe nespecifice, cum sînt conservarea, temperatura, precipitarea cu alcool, sau specifice, ca RN-aza sau neutralizarea cu ser imun, înlătură orice critică justificată. Ulterior, însă, unii cercetători susţin că prezenţa proteinei virale, fie chiar sub formă de urme, ar fi indispensabilă pentru ca ARN să-şi poată manifesta caracterul infectant. Am arătat cînd am vorbit despre ARN extras din virusurile fitopatogene, care sînt argumentele ce se înscriu contra acestui punct de vedere. În cazul ARN extras din virusul gripal, de la început ne-am ferit să căutăm prezenţa proteinei cu ajutorul reacţiilor chimice obişnuite, care ni s-au părut prea puţin sensibile şi prea puţin specifice. Pentru a pune în evidenţă urmele de proteine, am supus extractele fenolice obţinute din virusul gripal cromatografierii pe hîrtie, metodă extrem de sensibilă şi de exactă. Pe aceste cromatograme am putut descoperi prezenţa unor aminoacizi, fără însă a găsi proteine intacte (Portocală, Boeru şi Samuel, 1960 *b*; Portocală, 1961). Aceşti acizi aminaţi proveneau din proteina virală, degradată în cursul extracţiei, prin tratamentul brutal al fenolului. Ei nu pot avea nici un rol activ în manifestarea proprietăţii infectante a ARN viral. Dializarea extractelor, înainte de a le supune analizei cromatografice, face ca moleculele mici de acizi aminaţi să fie înlăturate din soluţie. Prin acest artificiu, pe cromatograme nu se mai pot pune în evidenţă spoturile caracteristice ale acestor compuşi şi cu atît mai puţin cele ale moleculelor intacte de proteine, care

după cum am arătat mai sus, nu erau prezente nici înainte de dializă. În schimb însă extractul continuă să conţină ARN, care în continuare se dovedeşte infectant. Hidrolizat şi cromatografiat, acest acid nucleic dovedeşte că este un ARN, deoarece spoturile găsite pe hîrtia cromatografică corespund guaninei, adeninei, citozinei şi uracilului.

Rezultatele pozitive obţinute în laboratorul nostru privind infectivitatea ARN extras din virusul gripal au fost confirmate de unii autori, în timp ce alţii nu au putut reproduce experienţele noastre. Astfel, Ada şi colab. (1959), fără a fi cunoscut cercetările noastre, nu obţin un ARN infectant din virusul gripal. Pe de altă parte, Sokol şi Szurman (1959), într-o lucrare care urmează imediat după a noastră (Portocală şi colab., 1959 *c*), arată că nu reuşesc să ne confirme rezultatele, deşi, arată autorii, au utilizat metoda preconizată de noi. Ar depăşi cu mult cadrul acestui volum o analiză a rezultatului lui Sokol şi Szurman şi a condiţiilor lor experimentale, care, cu toată afirmaţia autorilor, diferă de ale noastre.

După mai puţin de un an de la obţinerea primelor noastre rezultate pozitive, Maassab (1959) extrage cu ajutorul fenolului la rece din membrane corioalantoidiene infectate cu virus gripal de tip A, un ARN infectant pentru celulele renale de găină cultivate *in vitro*. Probele de control realizate de Maassab arată că produsul infectant este inactivat atît de menţinerea timp de 3 ore la 37°, cît şi de acţiunea degradantă a RN-azei. Fără a cunoaşte rezultatele noastre, cele obţinute de Maassab în privinţa acestor probe de control se suprapun perfect cu cele obţinute de noi. Autorul constată şi el imposibilitatea înregistrării unui rezultat pozitiv după diluarea extractului peste un anumit prag. Infectivitatea ARN este, în experienţele sale, de 0,2% faţă de titrul tulpinii de virus gripal. Totuşi, această activitate poate fi crescută la 0,4% dacă se realizează diluţia într-un lichid hipertonic. Reamintim cu această ocazie cercetările lui Alexander referitoare la îmbunătăţirea rezultatelor atunci cînd ARN extras din virusul poliomielitic este diluat înainte de inoculare într-un amestec salin hipertonic. Rezultatele lui Maassab diferă de cele ale noastre prin aceea că acest autor nu poate extrage un ARN infectant din virusul purificat, ci numai din membrana corioalantoidă, infectată cu virusul gripal. Ulterior, Maassab (1963) utilizează în cercetările sale asupra ARN din virusul gripal tehnica noastră de extracţie cu eter-fenol, ceea ce îl face să conchidă că : „o combinare a tratamentului cu eter şi fenol a celulelor infectate cu virus gripal a fost o metodă mult mai eficientă pentru izolarea acidului ribonucleic infectant decît tratamentul cu fenol singur". Caracterizarea spectrofotometrică a acestui ARN arată că prezintă un maxim de absorbţie la 260 mμ iar rezultatul raportului 260/280 este de aproximativ 2, ceea ce indică lipsa unei contaminări cu proteină. Precipitarea cu alcool în concentraţia de 66% la +4° dovedeşte că, în timp ce virusul este complet inactivat în aceste condiţii, precipitatul soluţiei de ARN îşi păstrează nealterată activitatea. Conservarea la —70°C a ARN şi a virusului a dat rezultate care dovedesc de asemenea că produsul infec-

tant este constituit din ARN. Reproducem tabelul publicat de Maassab referitor la această experiență demonstrativă (tabelul 25).

Tabelul 25

Stabilitatea acidului ribonucleic păstrat la —70°C (după Maassab, 1963)

Zile de păstrare	Titru infectant DIC_{50}/ml	
	ARN	Virus
2	2,0	6,3
4	2,0	6,0
6	1,7	6,3
7	1,7	6,0
9	0	6,0
10	0	6,0

Cercetări comparative asupra randamentului metodelor de extracție, aplicate obținerii ARN din virusul gripal au fost de asemenea realizate și de Sokol și colab. (1963, 1964). Autorii fac o comparație între metoda lui Gierer și Schramm (1965 *a*, *b*) cu fenol, a noastră (Portocală și colab. 1959 *a*) cu eter-fenol și aceea în care se utilizează un detergent (dodecil-sulfat de sodiu) combinat cu fenol. Autorii lucrează cu o tulpină de virus gripal de tip A_2 purificat printr-o metodă complexă de absorbție-eluție pe și de pe eritrocite de cocoș, cominată cu cicluri succesive de ultracentrifugare și centrifugări la turație joasă. Virusul este în continuare purificat și concentrat cu ajutorul cromatografiei pe coloană de DEAE-celuloză. Virusul gripal de tip A_2 astfel purificat prezintă în ultracentrifuga analitică un singur vîrf asimetric, ceea ce dovedește că produsul nu este omogen. Se poate astfel constata că preparatul conține elemente virale cu o constantă de sedimentare de 610 ± 12 *S*, care reprezintă majoritatea cantității preparatului, și elemente cu o constantă de 328 *S*, reprezentate probabil de virusul în formă incompletă.

Extragerea ARN din acest preparat a fost realizată în patru moduri diferite și la temperaturi variate. Tabelul 26 sintetizează rezultatele obținute de Sokol (1964).

Rezultă din aceste cercetări că extracția combinată eter + fenol, preconizată de noi, dă un randament mai ridicat decît extracția cu fenol singur. Pe de altă parte, metoda cu dodecil-sulfat de sodiu și fenol extrage în general o cantitate mai mare de ARN însă prezintă variații cantitative de la extracție la extracție. De asemenea, produsul extras de Sokol fiind lipsit întotdeauna de activitatea infectantă, rezultatele obținute nu pot fi comparabile din acest punct de vedere.

Din rezultatele obținute de Sokol și colab. (1963) reiese că ARN extras din virusul gripal este monocatenar, cu un punct de topire mediu de 51°C.

Scanned with OKEN Scanner

Compoziţia bazelor este : guanină = 20,7 ; adenină = 26,4 ; citozina = 22,4 ; uracil = 30,5. Supus ultracentrifugării, acest ARN prezintă un singur maxim cu o constantă de sedimentare de 11 *S*. Totuşi, arată autorii, acest produs supus cromatografiei pe coloană de Ecteola, arată, pe lîngă această fracţiune de 11 *S*, care poate fi eluată numai cu NaOH(0,1M), existenţa unei alte fracţuni, prezentă unori în proporţie de 30%, care se eluează cu o soluţie 0,2 M de NaCl.

Tabelul 26

Randamentul acidului ribonucleic extras din virusul gripal A_2 prin diferite metode (după Sokol şi Schramek, 1954)

Modul de izolare		Concentraţia virusului (mg/ml)	Recuperare ARN
Fenol	4°	1,97	9,8
	25°	1,97	44,3
	60°	2,64	41,1
Eter + fenol	4°	1,34	57,3
	4°	1,00	31,9
	25°	1,37—2,11	39,7
DDS + fenol	4°	2,76	79,7
	4°	2,16	100,2
	25°	2,44—3,32	86,0
	25°	1,14	105,5
	25°	1,04	106,6
Fenol + DDS	25°	2,16	53,6
	4°	2,72	12,5

În afară de rezultatele pozitive relatate de Maassab şi discutate mai sus, alţi autori au putut confirma rezultatele noastre referitoare la caracterul infectant al ARN extras cu ajutorul metodei eter-fenol, din virusul gripal. Astfel, Jumatov şi Isaeeva (1963), Orlova şi Diskina (1963) şi apoi Poliac şi Dubrovina (1963) au reuşit izolarea, din virusul gripal de tip A, a unui ARN înzestrat cu proprietăţi infectante pentru culturi celulare, embrionul de găină şi şoarece.

Toate aceste rezultate pozitive par a aduce un răspuns afirmaţiei făcută de Schaffer (1962) după care : „trebuie să conchidem că mixovirusurile sînt refractare la extragerea acidului nucleic infecţios" ; „datorită structurii complicate a mixovirusurilor şi a posibilităţii ca particula virală să conţină mai mult decît o moleculă de ARN... natura refractară a mixovirusurilor este explicabilă", adaugă autorul.

Caracterizarea acidului nucleic extras de noi din virusul gripal a fost realizată utilizîndu-se multiple metode fizico-chimice. Analiza curbelor spectrofotometrice obţinute în lumină ultravioletă a arătat, după dializă, că produsul studiat este un acid nucleic. Aceste rezultate, coroborate cu

analizele chimice calitative şi cu cele cromatografice pe hîrtie, dovedesc că extractul nostru este constituit din acid ribonucleic. Pe curbele spectrofotometrice (Portocală şi colab., 1961 *a*) se observă existenţa unui singur maxim situat la 258 mμ. Absenţa maximului de la 280 mμ atestă faptul că produsul obţinut de noi nu este impurificat cu proteine de natură virală sau de altă origine. Aceeaşi constatare este făcută şi de Sokol şi colab. (1963 şi 1964) după extragerea prin procedeele arătate mai sus a ARN din virusul gripal. De altfel, faptul că extractul nostru este sensibil la acţiunea RN-azei, care îi suprimă activitatea, dovedeşte o dată în plus că nu ne aflăm în prezenţa unei nucleoproteine. În acest din urmă caz, proteina ar fi apărat molecula de ARN de acţiunea depolimerizantă a enzimei, conservîndu-i întreaga activitate, aşa cum se întîmplă atunci cînd virusul întreg este supus acestui tratament.

Este cunoscut că alcoolul precipită dintr-o soluţie moleculele de ARN. Acest fenomen ne-a dat posibilitatea să studiem aspectul curbelor spectrofotometrice ale produsului după precipitare şi redizolvare în soluţie clorurată fiziologică. În aceste condiţii se obţine o curbă al cărei maxim este situat tot la 258 mμ. Faptul că precipitarea cu alcool a antrenat din soluţie o cantitate echivalentă cu 68% din cantitatea totală de ARN, ne arată că extractele noastre conţineau un procent ridicat de molecule înalt polimerizate. În supernatantul rezultat din precipitarea alcoolică se poate pune în evidenţă un minim pronunţat situat la 260 mμ şi un maxim la 290 mμ. Inflexiunea minimă înregistrată la 260 mμ se datoreşte înlăturării din soluţie a moleculelor de ARN antrenate în precipitat, în timp ce maximul de la 290 mμ îşi explică prezenţa datorită probabil existenţei unui amestec de acizi aminaţi şi alte substanţe neidentificate, care prezintă maximul de absorbţie spre lungimi de undă mai mari.

Cu ocazia cercetărilor întreprinse în ultimii ani asupra fracţionării unor acizi nucleici cu ajutorul cromatografiei pe coloană (Portocală şi colab., 1964 *a*), după o tehnică proprie (Portocală şi Popa, 1964), am studiat şi comportarea acidului ribonucleic extras din virusul gripal şi supus acestei analize (Portocală şi colab., 1964 *b*).

Metoda cromatografiei pe coloană a fost utilizată recent pentru izolarea fracţiunilor de ARN. Astfel, Cochran şi Childester (1957) folosesc DEAE-celuloza, iar Lippincot (1960) Ecteola-celuloza pentru fracţionarea ARN din VMT.

În continuarea cercetărilor noastre asupra rolului infectant al ARN extras din virusul gripal, am studiat cu ajutorul tehnicii de cromatografiere pe coloană de DEAE-celuloză acest compus, comparativ cu ARN extras din membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat, neinfectat. Rezultatele au fost obţinute prin cromatografierea pe coloană de DEAE-celuloză a probelor de ARN, extras după metoda noastră cu eter-fenol, din virusul gripal de tip A (tulpina PR8). Virusul a fost purificat prin metoda absorbţiei-eluţiei şi prin metoda centrifugării fracţionate; pentru ambele metode s-a utilizat lichid alantoidian recoltat din ouă infectate cu virus gripal.

Scanned with OKEN Scanner

Absorbţia ARN s-a făcut pe coloane de 5 × 1,5 cm, echilibrate cu tampon fosfat 0,05 M la pH 6,7. Eluţia fracţiunilor se realizează în flux continuu cu ajutorul unui gradient de NaCl, iar citirea şi determinarea fracţiilor este efectuată prin citire continuă în lumină ultravioletă monocromatică (Portocală şi Popa, 1964). Pentru a compara rezultatele, s-a realizat analiza cromatografică a ARN extras în aceleaşi condiţii, însă din celulele membranei corioalantoide neinfectate (MCA).

Rezultatele obţinute prin înscrierea curbelor de eluţie a ARN viral şi din MCA sînt diferite. Astfel, în figura 133 *a* care reprezintă curba de

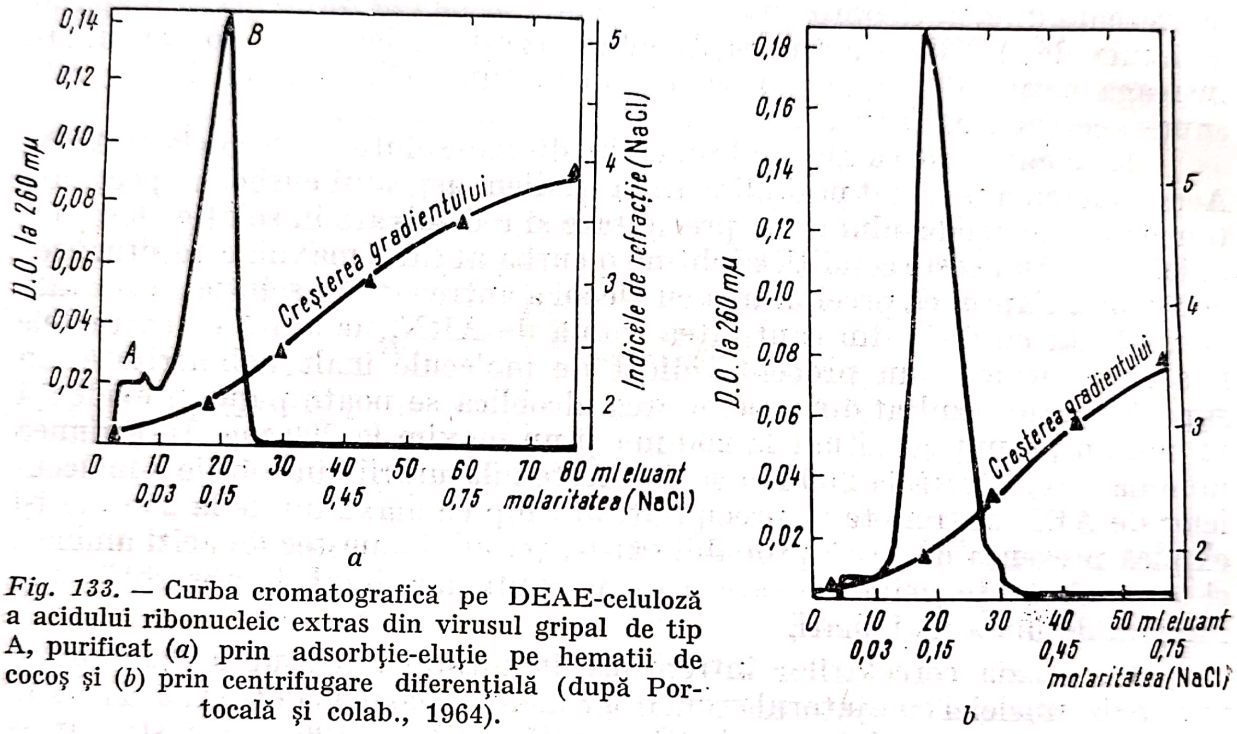


Fig. 133. — Curba cromatografică pe DEAE-celuloză a acidului ribonucleic extras din virusul gripal de tip A, purificat (*a*) prin adsorbţie-eluţie pe hematii de cocoş şi (*b*) prin centrifugare diferenţială (după Portocală şi colab., 1964).

eluţie a ARN extras din virusul gripal purificat prin adsorbţie-eluţie, se poate observa prezenţa a două maxime. Primul, notat cu litera *A*, este situat între gradienţii cuprinşi între 0 şi 0,03 M NaCl; al doilea, notat cu litera *B*, este situat între gradienţii 0,03 şi 0,26 M NaCl. Diagrama din figura 133 *b*, care reprezintă curba de eluţie a ARN extras din virusul gripal purificat prin centrifugare, este aproape identică cu aceea din figura 131. Se observă însă că în acest caz aspectul ei pledează pentru o omogenitate mai mare a moleculelor de ARN.

Curba de eluţie a ARN extras din MCA neinfectată este reprezentată în figura 115. De data aceasta remarcăm prezenţa a patru maxime (*A*, *B*, *C*, *D*). Primul (*A*) este situat între gradienţii 0,001 şi 0,04 NaCl, al doilea (*B*) între 0,04 şi 0,12 M NaCl, al treilea (*C*) între 0,12 şi 0,2 M NaCl, iar ultimul (*D*) între 0,45 şi 0,7 M NaCl.

În tabelul 27 sînt redate valorile relative ale fracţiunilor. Din el se constată că fracţiunea *B* a probei extrase din virusul purificat prin adsorb-

ţie-eluţie reprezintă 90% din cantitatea totală de ARN gripal eluat, în timp ce fracţiunea *A* reprezintă numai 10%. Valoarea relativă a fracţiunii *B* a probei extrase din virusul purificat prin centrifugare este de 97,5%, iar a fracţiunii *A* de 2,5%. În cazul ARN din MCA fracţiunea *A* constituie 12,5%, fracţiunea *B* 21,9%, fracţiunea *C* 38,5%, iar fracţiunea *D* 27,1%.

Din rezultatele prezentate reiese că avem de a face cu două tipuri distincte de ARN. Astfel, în timp ce ARN gripal prezintă o curbă de eluţie care are numai două maxime, curba de eluţie a ARN extras din MCA neinfectată are 4 maxime. În acelaşi timp, constatăm că evoluţia ARN gripal se face pe o zonă restrînsă de gradienţi, cuprinsă între 0 şi 0,26 M NaCl, iar ARN din MCA într-o zonă mult mai largă, delimitată de gradienţii 0,001 şi 0,7 M NaCl.

Tabelul 27

Valorile relative ale fracţiunilor acizilor ribonucleici gripal şi din membrana corioalantoidă, determinate din curbele de eluţie

Fracţiunile	*A*	*B*	*C*	*D*
ARN-gripal (virus purificat prin adsorbţie-eluţie)	10,0	90,0	—	—
ARN-gripal (virus purificat prin centrifugare)	2,5	97,5	—	—
ARN-MCA	12,5	21,9	38,5	27,1

Faptul că aproape întregul ARN gripal este cuprins într-o singură fracţiune (*B*) pledează pentru o mare omogenitate a moleculelor sale; subliniem că acest compus provine din virusul gripal purificat şi concentrat, care conţine un singur tip de ARN. Valorile relative ale celor două fracţiuni obţinute în cazul ARN viral, redate în tabelul 27, demonstrează că purificarea prin centrifugare a virusului gripal permite extragerea unui acid nucleic mai omogen.

Existenţa în cazul produsului extras din MCA neinfectată a patru maxime, care corespund la patru fracţiuni diferite, se datoreşte eterogenităţii ARN prezent în celulele acestui ţesut.

Pentru a aprofunda mecanismul sintezei ARN din virusul gripal, în cursul infecţiei celulelor sensibile din membrana corioalantoidă a oului embrionat de găină, am realizat un studiu cromatografic comparativ între compusul extras din virusul purificat, cel extras din membrana alantoidiană în cursul infecţiei cu acelaşi virus şi cel izolat din membrana normală (Portocală şi colab., 1964 *c*).

Figura 134 redă curbele obţinute prin cromatografierea pe coloană de AMC, a ARN extras din membrana corioalantoidă a oului embrionat,

Scanned with OKEN Scanner

infectată cu virusul gripal, comparativ cu aceea normală, ambele recoltate după 15 minute.

Din curbele trasate se observă că în ambele cazuri acidul nucleic prezintă 3 fracţiuni principale, notate cu *I*, *II* şi *III*. Menţionăm că frac-

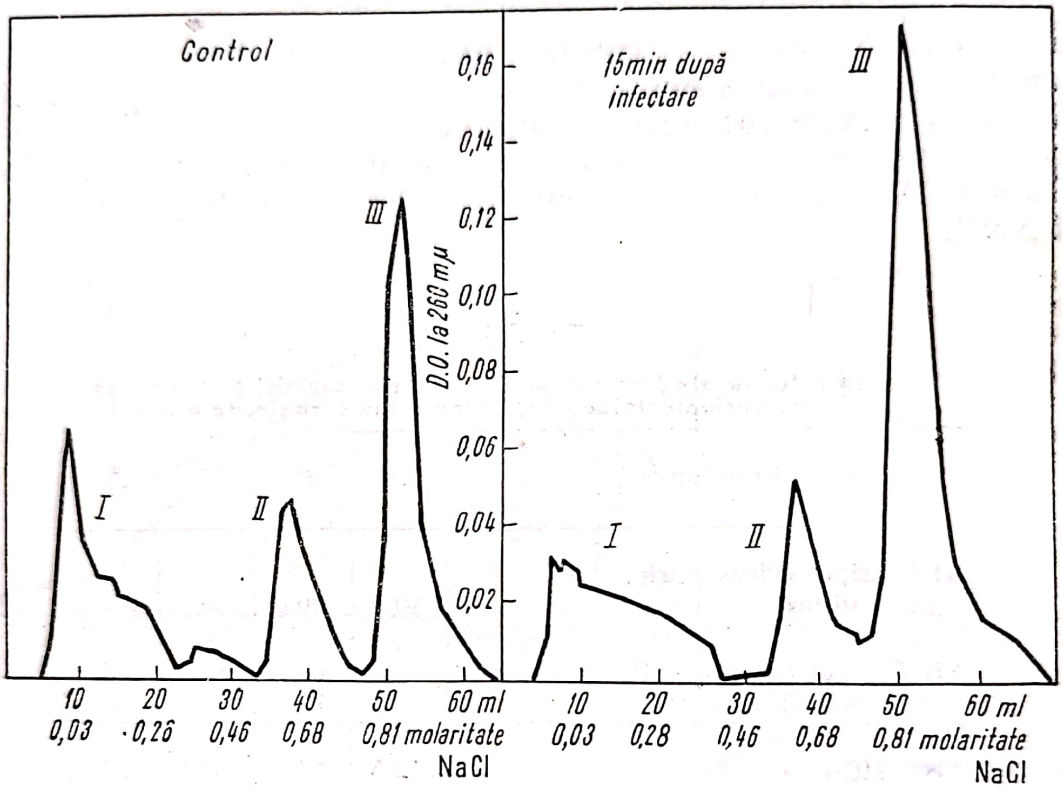


Fig. 134. — Curba cromatografică pe albumină metilată a ARN extras din membrana corioalantoidă a embrionului de găină normal şi după 15 min după inocularea virusului gripal de tip A (după Portocală şi colab., 1964).

ţiunile observate pe curbă la începutul eluţiei reprezintă fragmentele foarte mici din moleculele de ARN.

Din analiza curbelor se poate observa că atît în cazul ARN din MCA infectată, cît şi în cazul celui din MCA normală, cele 3 fracţiuni se eluează astfel: fracţiunea *I* la gradienţi cuprinşi între 0,28 şi 0,50 M NaCl, fracţiunea *II* la gradienţii cuprinşi între 0,50 şi 0,80 M NaCl, iar fracţiunea *III* între gradienţii 0,80 şi 0,95 M NaCl.

Compararea curbelor obţinute cu ARN din MCA infectată şi normală, recoltată 15 min după inoculare (fig. 134), arată că apar diferenţe între ele chiar după acest interval. Astfel, fracţiunea *III* a compusului extras din MCA infectată prezintă o creştere marcată a maximului extincţiei la 260 mμ, care atinge 0,17, în timp ce la martor el este de 0,13. Fracţiunile *II* ale produsului extras din cele două tipuri de membrane corioalantoide sînt asemănătoare, iar fracţiunea *I* prezintă în cazul membranei infectate o creştere şi o deplasare la gradienţi mai coborîţi de NaCl, demonstrînd faptul

că este compusă din molecule de ARN mai mici, pierzîndu-şi individualitatea şi contopindu-se cu prima fracţiune constituită din fragmente foarte mici.

Curba obţinută cu ARN din membranele recoltate 4 ore după inoculare este foarte asemănătoare cu a martorului în ceea ce priveşte valorile gradienţilor de NaCl la care se eluează cele 3 fracţiuni, cu observaţia că extincţia maximă este ceva mai coborîtă în cazul acidului nucleic din membrana infectată la toate cele 3 fracţiuni.

Cromatografierea ARN extras din membranele recoltate 6 ore după infectare ne-a arătat de asemenea diferenţe în valoarea fracţiunilor obţinute.

Astfel, în timp ce fracţiunea *II* a fost asemănătoare pe curbele produsului extras atît din membrana corioalantoidă normală cît şi în cea infectantă, fracţiunea *III* a prezentat în cazul acestuia din urmă o extincţie la 260 mμ de 0,185, superioară celei din membrana normală, care se situează la 0,16. Fracţiunea *I* a fost puţin mai coborîtă şi cu o suprafaţă mai mare pe curba obţinută cu acidul nucleic din membrana infectată, decît la martor, ceea ce a dovedit prezenţa unei cantităţi sporite de molecule fragmentate.

Rezultatele obţinute prin cromatografierea pe coloană a ARN extras din membrana alantoidiană infectată arată că modificările maxime se produc în fracţia ce cuprinde moleculele înalt polimerizate. Într-o altă serie de experienţe s-a urmărit comportarea ARN extraşi din membranele normale şi infectate cu virusul gripal faţă de coloanele cromatografice încărcate cu DEAE-celuloză. Astfel, după eluţia de pe DEAE-celuloză a produsului, recoltat 6 ore după inoculare, s-a constatat o scădere accentuată a fracţiunii de ARN din zona gradienţilor 0,03—0,28 M NaCl, zonă în care se eluează moleculele înalt polimerizate.

În cercetările realizate cu coloane de albumină metilată se constată pe curbele obţinute cu ARN din membrana infectată că primele modificări apar foarte curînd, chiar după primele 15 minute de la inoculare şi în acest caz modificările maxime se produc în fracţia *III*, care cuprinde moleculele înalt polimerizate şi constă într-o creştere marcată a ei. În proba recoltată 4 ore după infectare, curba cromatografică nu mai prezintă mari diferenţe faţă de martor, pentru ca după 6 ore de la inoculare cantitatea de ARN înalt polimerizat să crească din nou foarte mult.

Cromatografia făcută cu ambele tipuri de adsorbanţi demonstrează deci că modificările suferite de metabolismul celular al acizilor nucleici din MCA în urma infectării ei cu virusul gripal se situează în zona ARN înalt polimerizaţi, şi că cele mai accentuate modificări sînt în ambele cazuri la 6 ore după inoculare.

Datele obţinute cu AMC mai dau o informaţie suplimentară şi anume că primele modificări sînt foarte precoce, deoarece, după 15 min, ele sînt evidente.

Hoyle (1963), Burnet (1948) şi Fazekas şi St. Groth (1948), în cercetările făcute asupra multiplicării virusului gripal, arată că în primele 2 ore

Scanned with OKEN Scanner

după inoculare nu au reuşit prin analize chimice să găsească prezenţa virusului în celulă. Abia după 2 ore apare o ribonucleoproteină cu proprietatea de a fixa complementul, fără a fi însă infectantă. După 3-4 ore de la inoculare apar aglutininele şi antigenul fixator de complement specific, diferit de primul care este solubil şi nespecific. Primele particule virotice infectante apar la 5-6 ore şi numărul lor creşte apoi rapid în lichidul alantoidian.

Datele prezentate, care arată că primul ciclu de biosinteză a virusului gripal durează 6 ore, explică într-o oarecare măsură faptul că cele mai semnificative modificări găsite de noi prin cromatografierea ARN din membrana alantoidiană infectată sînt situate la 6 ore după inoculare. În acelaşi timp, cromatografia pe coloană se dovedeşte a fi o metodă foarte sensibilă întrucît pe albumina metilată s-au putut pune în evidenţă modificări în metabolismul ARN celular chiar după 15 min de la inoculare, ceea ce nu este posibil prin alte determinări decît după 2 ore.

Din curbele obţinute în cursul acestor cercetări, se poate constata o creştere a cantităţii de ARN înalt polimerizat, la 6 ore după inocularea membranelor alantoidiene.

Se poate afirma, în urma acestor rezultate, că în cursul biosintezei virusului gripal în oul embrionat de găină se produc anumite perturbări structurale ale acizilor nucleici celulari, decelabile încă din primele 15 minute. Cromatografia pe cei doi adsorbanţi permite să se constate că aceste modificări sînt pe de o parte de ordin cantitativ, iar pe de alta se adresează însăşi structurii moleculei.

ASPECTE MORFOLOGICE

Cercetările realizate cu ajutorul microscopului electronic asupra ARN extraşi din virusuri şi înzestraţi cu proprietăţi infectante erau relativ puţine la număr în momentul cînd am abordat acestă direcţie asupra ARN infectant extras din virusuri gripal. Astfel, Schuster şi colab. (1956) şi Hall (1958) studiaseră aspectul morfologic al ARN extras din VMT.

Pentru cercetările noastre noastre (Portocală şi colab. 1961) am întrebuinţat tulpina de virus gripal din care am extras în mod constant un ARN infectant. Această tulpină este de tip antigenic A pur. Metoda de extracţie folosită în mod curent în cercetările noastre a furnizat ARN necesar studiului morfologic (Portocală şi colab., 1959 *a*). Extractele astfel obţinute au servit la realizarea preparatelor pentru microscopia electronică. Am examinat astfel numeroase preparate efectuate cu produsul recoltat în diferitele etape succesive ale extracţiei fenolice. Cele mai demonstrative imagini au fost făcute cu ajutorul preparatelor obţinute înainte de dezintegrarea completă a virusului (fig. 135).

Extractele depuse pe grile acoperite cu membrane de formvar au fost lăsate să se usuce la temperatura camerei. Prepartele au fost ulterior spălate cu acid acetic M/1 000, după tehnica indicată de Schuster (1956), şi umbrite prin depunerea unui aliaj de aur-paladiu.

Scanned with OKEN Scanner

Trebuie să atragem atenţia că datele obţinute de diferiţii autori care au studiat ARN din punct de vedere morfologic sînt contradictorii. Astfel, grosimea filamentelor de ARN izolat din *E. coli* de Littauer şi colaboratori (1960) este de 10—13 Å, iar cele examinate de Terada (1958) de 14—17 Å. Acidul nucleic extras de Schuster şi colaboratori (1956) din VMT are un diametru de 15 Å, în timp ce cifra obţinută de Hall (1958) cu acest din urmă compus este de 30 Å. Diferenţele înregistrate de aceşti autori sînt datorite modificărilor mecanice survenite în cursul executării preparatelor sau ele reprezintă cifre reale? În acest din urmă caz, diferenţele dimensionale ar putea fi atribuite naturii variate a acizilor nucleici, datorită provenienţei lor diferite. Este totuşi puţin probabil ca acest din urmă punct de vedere să corespundă realităţii. Credem mai curînd că, în special cifra obţinută de Hall s-ar putea explica, aşa cum de altfel o interpretează şi autorul, printr-o strîngere a spiralei moleculei, ceea ce i-ar mări diametrul aparent.

Rezultatele obţinute de noi prin măsurătorile executate pe clişeele electronice ale celor mai fine filamente care pot fi observate ne-au arătat cifre identice cu cele obţinute de Hall. Examinînd fotografiile noastre se observă prezenţa filamentelor de ARN bine puse în evidenţă prin tehnica de umbrire. De asemenea se înregistrează existenţa elementelor virotice corpusculare, a căror formă însă este profund alterată de tratamentul cu fenol. Cum am menţionat mai sus, aceste preparate au fost efectuate cu produse recoltate în cursul extracţiei şi nu la sfîrşitul ei, ceea ce explică persistenţa virusului, modificat totuşi morfologic. Este cazul să menţionăm că preparatele microscopice executate la sfîrşitul extracţiei nu au pus în evidenţă filamentele de ARN, probabil credem noi, datorită puterii de rezoluţie a microscopului electronic cu ajutorul căruia am examinat preparatele şi care depăşeşte cifra atribuită moleculei de ARN, şi anume 10—17 Å. Remarcăm totuşi că aceste extracte prezentau în mod constant caracterul infectant cunoscut.

Corpusculii virotici ce persistă încă în extractele examinate prezintă, aşa după cum se vede în figura 135, o morfologie profund alterată. Polimorfismul accentuat caracterizează aceste elemente şi traduce efectul brutal al fenolului care modifică structura chimică şi morfologică a virusului în stadiul ce precede eliberarea de ARN. Astfel se observă o gamă variată de aspecte, de la corpusculi încă bombaţi care îşi mai păstrează relieful, pînă la elemente complet turtite, evident lipsite de conţinut. În numeroase cazuri se remarcă la una din extremităţile corpusculilor alungiţi existenţa unui filament a cărui lungime este variabilă şi care reprezintă după toate probabilităţile, acidul ribonucleic pe cale de a fi eliberat. Pe unele din imaginile noastre se observă în modul cel mai evident cum aceste filamente se înmănunchiază, dînd naştere la cordoane groase de ARN, pe suprafaţa cărora corpusculi virotici rămîn agăţaţi prin intermediul filamentelor lor.

Littauer şi colab. (1960) atrag atenţia, în lucrarea lor, asupra influenţei compoziţiei soluţiei saline în care ARN este dizolvat, faţă de agregarea

moleculelor acestui compus. Este posibil ca prezenţa sărurilor în soluţiile noastre, în cursul extracţiei, sau a fenolului, să fi determinat agregarea moleculelor de ARN, vizibile pe fotografiile noastre. Totuşi, în unele porţiuni mănunchiurile se desfac, ceea ce ne-a permis să realizăm dimensionarea diametrelor fibrilelor. Cele mai fine fibre observate în aceste condiţii au, aşa cum am arătat mai sus, un diametru de 30 Å. Această cifră a fost obţinută după ce am aplicat un factor de corecţie care reprezintă grosimea stratului de metal depus prin umbrire.

În ceea ce priveşte mărimea cifrei obţinute de noi, se pot emite mai multe ipoteze. În primul rînd se poate presupune că diametrul moleculei de ARN extras din virusul gripal este în realitate de 30 Å. Este totuşi puţin plauzibil ca această explicaţie să corespundă realităţii, deoarece cifrele obţinute de Littauer sau de Terada, ca şi cele ale lui Schuster, indică un diametru al moleculei cuprins între 10 şi 17 Å. Chiar Hall care dă cifra de 30 Å se întreabă dacă ea corespunde realităţii şi caută să o explice prin strîngerea spiralei de acid nucleic. A doua ipoteză presupune deproteinizarea incompletă a moleculelor de ARN, datorită întreruperii acţiunii fenolului în cursul extracţiei. Aceasta ar explica apariţia unor filamente de nucleoproteină parţial deproteinizată şi al căror diametru este superior moleculei de ARN. Cercetările morfologice realizate de Horne şi colab. (1960) şi Horne şi Waterson (1960) asupra virusurilor gripale, Sendai, Newcastle şi urlian, după distrugere parţială prin tratare cu eter, arată expulzarea din interiorul corpusculului a unui filament cu aspect bispiralat. Diametrul acestor filamente este de aproximativ 30 Å, cifră care coincide cu aceea obţinută prin examinarea preparatelor noastre, în care virusul fusese delipidat cu eter şi parţial deproteinizat cu fenol. În cazul în care extracţia fenolică este continuată după tehnica obişnuită, moleculele de ARN complet deproteinizate prezintă dimensiuni inferioare puterii de rezoluţie a microscopului întrebuinţat de noi. O altă interpretare care ar putea fi dată diametrului de 30 Å găsit de noi este posibilitatea de alipire în lungime a două fibre de aproximativ 15 Å fiecare. Din datele arătate mai sus, autorii au ajuns la concluzia că această cifră reprezintă diametrul ARN extras din VMT. Este posibil ca în condiţiile noastre experimentale substanţele chimice prezente în soluţie să favorizeze agregarea moleculelor, astfel încît cele mai fine fibre, decelabile cu microscopul întrebuinţat, să aibă un diametru de 30 Å ele reprezentînd totuşi un pachet de două macromolecule alipite. În sfîrşit, o ultimă explicaţie este aceea dată de Hall pentru cifra obţinută de el. Se ştie că în funcţie de electroliţii existenţi în soluţie, molecula de ARN se poate strînge sau alungi, ceea ce îi creşte sau îi descreşte diametrul aparent. Prezenţa sărurilor şi a fenolului, existente la un anumit moment în extractele noastre, moment în care am recoltat probele, ar putea explica strîngerea moleculei de ARN. În acelaşi timp absenţa acestor substanţe în extractele finale poate justifica imposibilitatea punerii în evidenţă în aceste extracte a moleculelor de ARN, revenite

Fig. 135. — Corpusculi gripali de tip A profund degradaţi în timpul extracţiei fenolice. Filamente de acid ribonucleic. Mărire 25 000 × (după Portocală şi colab., 1961).

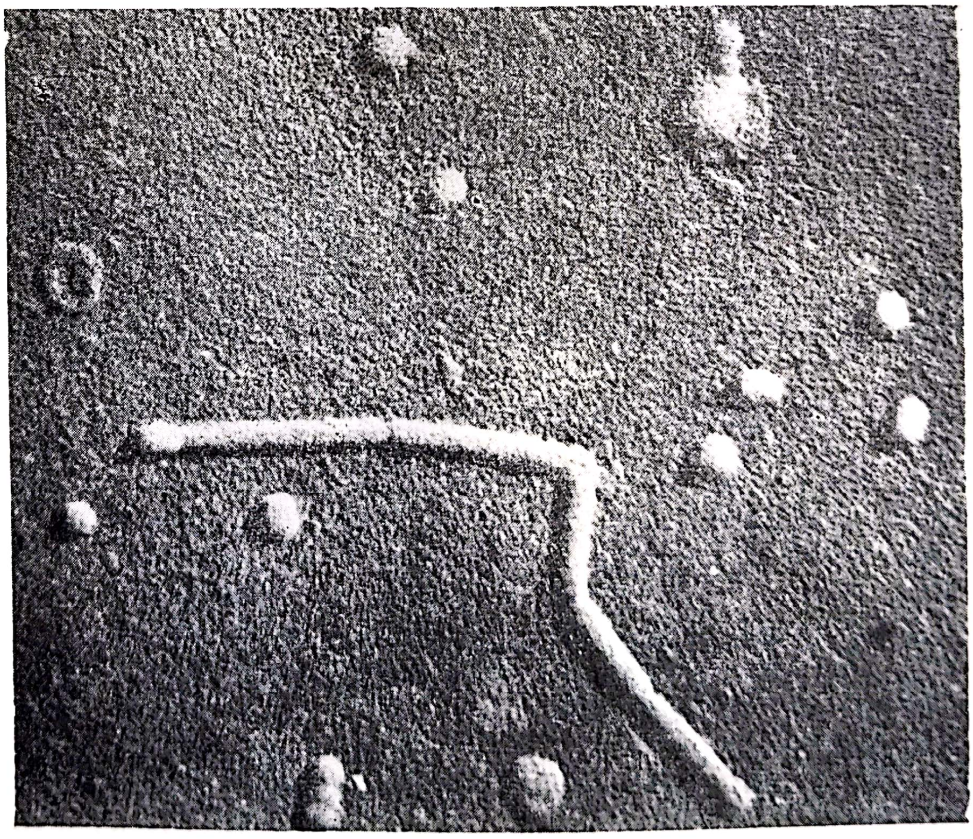


Fig. 136. — Virus gripal generat sub acţiunea inductivă a acidului ribonucleic inoculat în oul embrionat. Mărire 40 000 × (după Portocală şi colab., 1960).

Scanned with OKEN Scanner

la diametrul de 10—17 Å prin derularea spiralei sau desfăcute în subunităţi datorită forţei ionice slabe.

În ceea ce priveşte aspectul morfologic al virusului gripal sintetizat de celulele membranei corioalantoidiene sub acţiunea inductivă a ARN infectant, singurele studii realizate în această direcţie au fost făcute în laboratorul nostru (Portocală şi colab., 1960 *c*, *d*, *e*).

Caracterele morfologice ale tulpinii de virus gripal, care a servit în unele din cercetările noastre, puse în evidenţă cu ajutorul microscopului electronic, ne-au arătat că acest virus, de tip antigenic A, este reprezentat prin corpusculi sferici, bombaţi, cu un diametru mediu de 101 ± 1,2 mμ (Portocală şi colab., 1959 *h*). Virusul gripal generat sub acţiunea ARN se prezintă sub forma de corpusculi sferici cu un diametru de 103,4 mμ. Este de remarcat că pe aceste preparate lipsesc formele turtite, inelare, prezente în tulpina iniţială şi pe care le considerăm forme incomplete ale virusului gripal (Portocală şi colab., 1958; 1959 *g*). Formele filamentoase ale virusului, frecvente în noua tulpină şi care caracterizează virusul gripal recent izolat, sînt în acest caz întrerupte din loc în loc, probabil datorită unui început de fragmentare spre formele sferice.

Examinat la prima trecere în oul embrionat, virusul generat din ARN prezintă unele particularităţi care îl diferă de tulpina iniţială. Astfel, alături de formele sferice caracteristice, se observă elemente cu aspect de cilindri scurţi a căror dimensii sînt cuprinse între 106,6/142,1 mμ şi 142,1/177,6 mμ. Dimensiile elementelor sferice sînt de 99,5 mμ în mare majoritate a cazurilor. Se poate de asemenea remarca prezenţa altor formaţiuni, turtite, care posedă un corp interior dens, adevărat „miez". Talia acestor formaţiuni este de 113,7 mμ. Pe măsură ce se realizează trecerile în serie ale acestui virus în oul embrionat, dimensiile lui tind să se apropie de cele ale virusului iniţial, ajungînd la 100,7 ± 0,6 mμ, chiar din al doilea pasaj. De asemenea, formele filamentoase sînt din ce în ce mai rare, în timp ce formele plate, inelare, se înmulţesc (fig. 136).

Cercetările serologice dovedesc că tulpinile astfel sintetizate, plecînd de la acidul ribonucleic infectant, îşi păstrează caracterul antigenic, acelaşi cu al tulpinii iniţiale.

Concluziile la care obligator trebuie să ne oprim în urma cercetărilor realizate de noi cu virusurile mari, liponucleoproteice, complexe din punct de verdere chimic, ca virusul gripal şi Newcastle (Portocală, Boeru şi Samuel, 1959 *a*, *c*) pot fi extinse şi la virusurile mici, nucleoproteice, despre care s-a discutat în acest capitol. Ele au fost sintetizate de Portocală în 1960 într-o serie de consideraţii teoretice (Portocală, 1960 *b*, *c*).

Acidul ribonucleic viral pătruns în celula sensibilă obligă procesele de sinteză celulară să elaboreze un acid nucleic identic cu cel exogen. Metabolismul celular specializat în sinteza unui ARN necesar proceselor biologice normale, fiziologice, este deviat astfel spre elaborarea unui ARN diferit de cel preexistent, celular, şi anume a unuia de natură virală. Rezultă că ARN exogen, de origine virală, serveşte ca tipar acestei noi sinteze,

Scanned with OKEN Scanner

tipar cu ajutorul căruia noi molecule se formează. Această inducție intracelulară nu poate avea însă loc decît în prezența unor molecule de ARN a căror structură moleculară nu a fost modificată de agenți chimici sau fizici. În acest din urmă caz, este de presupus că moleculele de ARN astfel fragmentate, sub o anumită limită, intră în ciclul obișnuit metabolic celular și în consecință suferă aceeași soartă ca orice alt acid nucleic exogen, de altă natură decît cea virală.

Noile molecule de ARN apărute în celula care le-a sintetizat, în număr considerabil mai mare față de numărul redus de molecule inoculate, sînt identice cu cele ale virusului din care provine acidul ribonucleic viral infectant, inoculat. Ele servesc drept schelet viitorului virus deoarece pe ele se grupează ceilalți constituenți ai corpusculului elementar. Astfel, se vor aduna în jurul noilor molecule de acid nucleic și vor constitui elementul corpuscular viral, fracțiunile proteice, lipidice, glucidice etc. ale virusurilor mari, complexe și numai fracțiunea proteică la cele mici, simple.

Se poate admite că o anumită modalitate de grupare în spațiu a acestor constituenți chimici virotici este întodeauna aceeași cînd moleculele de acid nucleic provin de la același virus. Această afirmație se bazează pe constatarea experimentală după care un ARN extras dintr-un anumit virus induce întodeauna sinteza virusului omolog. Rezultă deci existența unei specificități stricte, atît în configurația moleculelor de acid nucleic, cît și în așezarea ulterioară a fracțiunii proteice. Această din urmă fracțiune determină antigenitatea virusului, iar modul său de așezare spațială condiționează pe de o parte specificitatea sa, iar pe de alta aspectul morfologic al noului corpuscul viral.

Sîntem îndreptățiți pe deplin să afirmăm că specificitatea fracției proteice este condiționată de așezarea spațială a moleculelor de acid nucleic, caracterizată și ea de o specificitate strictă legată de tipul de virus. Pe aceste molecule celula este forțată să depună proteina într-un anumit mod, întodeauna același pentru același tip de acid nucleic, deci pentru același tip de virus.

Virusul astfel sintetizat în întregime de celula sensibilă sub influența cîtorva molecule de acid nucleic exogen, virus în cantitate mult mai mare decît moleculele de ARN inoculate, devine din acest moment complet străin de celula care totuși l-a generat.

Acest punct de vedere, formulat în 1960, este astăzi întărit și precizat prin descoperirile recente asupra biosintezei intracelulare a virusurilor ce conțin ARN. Este cunoscut faptul că ARN infectanți sînt macromolecule cu dimensiuni mari a căror greutate moleculară este de aproximativ 2×10^6, ceea ce corespunde unui lanț compus din aproximativ 6 400 de nucleotide. Acest număr imens care ar trebui să conțină o mare cantitate de informații au totuși în acest caz un număr limitat de funcțiuni cunoscute pînă în prezent.

Într-adevăr se știe că pentru codificarea sintezei unei proteine de tipul celeia a VMT care conține 158 de acizi aminați sînt suficiente apro-

ximativ 500 de nucleotide. De aici rezultă că molecula de ARN infectant conţine un mare număr de informaţii utilizate numai în parte pentru codificarea proteinei de înveliş.

Cercetări recente dovedesc că ARN infectant, o dată pătruns în celula sensibilă, determină sinteza unei alte proteine, de data aceasta o enzimă şi anume polimeraza virală. Aceasta are rolul fundamental în sinteza noilor molecule de ARN viral. În cursul acestui nou tip de sinteză cercetătorii descoperă astăzi apariţia unui ARN care nu fusese bănuit. Studiul proprietăţilor acestui compus au arătat că este vorba de un ARN cu totul particular deoarece molecula sa este constituită din două lanţuri, simulînd astfel molecula de ADN.

Rolul acestui ARN bicatenar, a cărui sinteză a fost indusă de polimeraza virală, pare a fi de tipar, indispensabil sintezei moleculelor de ARN infectant, monocatenar. Acesta din urmă, prin informaţia pe care o cuprinde, determină sinteza proteinei care îl va îmbrăca, ca şi sinteza unor noi molecule de polimerază virală care asigură continuarea ciclului de biosinteză virală.

Virusul nou sintetizat este identic atît din punctul de vedere al constituţiei chimice cît şi al comportamentului biologic cu virusul din care acidul nucleic fusese extras şi astfel transportă aceeaşi cantitate şi acelaşi tip de informaţie care va determina într-o nouă celulă perpetuarea aceluiaşi tip de virus.

Ada G. L. (1957), în *The nature of viruses*, Edit. Churchill, Londra, p. 104.
Ada G. L., Gottschalk A. (1956), Biochem. J., **62**, 686.
Ada G. L., Perry B. T. (1954), Austr. J. exp. Biol. Med. Sci., **32**, 453.
Ada G. L., Lind P. E., Larkin L., Burnet F. M. (1959), Nature, **184**, 360.
Agatov P. A. (1941 *a*), Biohimiia, **6**, 269.
Agatov P. A. (1941 *b*), Dokl. Acad. Nauk, **33**, 171.
Alexander H. E., Koch G., Mountain I. M., Van Damme O. (1958 *a*), J. exp. Med., **108**, 493.
Alexander H. E., Koch G., Mountain I. M., Sprunt K., Van Damme O. (1958 *b*), Virology, **5**, 172.
Arnstein H. R. V., Cox R. A., Hunt J. A. (1962), Nature, **194**, 1 042.
Arnstein H. R. V., Cox R. A., Hunt J. A. (1963), *Proc. IX Congr. europ. Soc. Hematol.*, Lisbon, p. 575.
Arnstein H. R. V., Cox R. A., Hunt J. A. (1964), Biochem. J., **92**, 648.
Barondes S. H., Dingman C. W., Sporn M. B. (1962), Nature, **196**, 145.
Bawden F. C., Kleczkowski A. (1959), Virology, **7**, 375.
Bawden F. C., Pirie N. W. (1937), Proc. Roy. Soc. (Londra), **123**, 274.
Berg P. (1956), J. biol. Chem., **222**, 1 025.
Bergman F. H., Berg P., Dieckmann M. (1961), J. biol. Chem., **236**, 1 735.
Boedtker H. (1959), Biochim. Biophys. Acta, **32**, 519.
Brachet J. (1941), Enzymologia, **10**, 87.
Brenner S., Jacob F., Meselson M. (1961), Nature, **190**, 576.
Burnet F. M. (1948), Lancet, **1**, 7.

Horne R. W., Waterson A. P., Wildy P., Farnham A. E. (1960), Virology, **11**, 79.
Hoyle L. (1952), J. Hyg. (Londra), **50**, 229.
Hoyle L. (1953), în *The nature of virus multiplication*, Cambridge University Press, 225.
Hoyle L., Horne R. W., Waterson A. P. (1961), Virology, **13**, 448.
Huang R. C., Meheshwari N., Bonner J. (1960), Biochem. Biophys. Res. Comm., **3**, 689.
Huck R. A. (1964), Veter. Bull., **34**, 239.
Hurwitz J., Bresler A., Diringer R. (1960), Biochem. Biophys. Res. Comm., **3**, 15.
Hurwitz J., Furth J. J., Malamy M., Alexander M. (1962), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **48**, 1 222.
Jeener H., Jeener R. (1952), Exp. Cell Res., **3**, 675.
Jeener R. (1959), Biochim. Biophys. Acta, **35**, 166.
Jeener R., Lemoine P. (1953), Nature, **171**, 935.
Jacob F., Monod J. (1961). J. mol. Biol., **3**, 318.
Jumatov H. I., Isaeeva E. S. (1963), Respirat. virus. infect., Moscova, p. 47.
Kanazir D., Errera (1954), Biochim. biophys. Acta, **14**, 62.
Kaper J. M., Steere R. L. (1959 *a*), Virology, **7**, 127.
Kaper J. M., Steere R. L. (1959 *b*), Virology, **8**, 527.
Kelner A. (1953), J. Bacteriol., **65**, 252.
Knight C. A. (1947), J. exp. Med., **86**, 125.
Knight C. A. (1954), *Advances in virus research*, **2**, 153.
Knight C. A., Stanley W. M. (1941), J. biol. Chem., **141**, 39.
Knight C. A., Woody B. R. (1958), Arch. Biochem. Biophys., **78**, 460.
Kyeldgaard N. O. (1961), Biochim. Biophys. Acta, **49**, 64.
McLaren A. D., Takahashi W. N. (1957), Rad. Res., **6**, 532.
McLaren A. D., Holland J. J., Syverton J. T. (1959), J. exp. Med., **109**, 475.
McLaren A. D., Shugar D. (1964), în *Photochemistry of proteins and nucleic acids*, Pergamon Press, New York, p. 273.
Lauffer M. A., Bendet J. J. (1954), *Advances in virus research*, **2**, 241.
Lauffer M. A., Trkulat S., Buzzell A. (1956), Nature, **177**, 890.
Leslie I. (1955), în *Nucleic acids*, Academic Press, New York, vol. II, p. 1.
Lippincott J. A. (1960), Virology, **13**, 348.
Littauer U. Z., Danon D., Marinovsky Y. (1960), Biochim. Biophys. Acta, **42**, 435.
Lwoff A. (1957), J. gen. Microbiol., **17**, 239.
Lwoff A., Anderson T. F., Jacob F. (1959), Ann. Inst. Pasteur, **97**, 281.
Maassab H. F. (1959), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **45**, 877.
Maassab H. F. (1963), J. Immunol., **90**, 265.
Mandel J. D., Hershey A. D. (1960), Ann. Biochem., **1**, 66.
Markham R. (1953), *Advances in virus research*, **1**, 315.
Markham R., Smith K. M. (1949), Parasitology, **39**, 330.
Matthaei J. H., Jones O. W., Martin R. G., Nirenberg M. W. (1962), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **48**, 666.
Matthews R. E. F. (1954), J. gen. Microbiol., **10**, 521.
Maxwell E. S. (1962), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **48**, 1 639.
Mitra S., Kaesberg P. (1963), Biochem. Biophys. Res. Comm., **41**, 146.
Monod J., Changeux J. P., Jacob F. (1963), J. mol. Biol., **6**, 306.
Montgremier H. A. (1963), C. R. Acad. Sci., **257**, 2 201.
Nakamura M., Ueno Y. (1964), Proc. Soc. exp. Biol. Med., **117**, 700.
Nakata A., Sekiguchi M., Kawamata J. (1961), Nature, **189**, 246.
Nathans D., Lipmann F. (1961), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **47**, 497.
Nicolau S. (1938), în *Les ultravirus des maladies humaines*, Ed. Maloine, Paris, p. 330.
Nicolau Șt. S. (1951), St. cerc. inframicrobiol., **2**, 13.
Nicolau Șt. S. (1956), *Elemente de inframicrobiologie generală*, Edit. Acad. R.P.R., București, p. 2.
Nirenberg M. W., Matthaei J. H. (1961), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **47**, 1 588.
Nirenberg M. W., Jones O. W. (1963), Symp. Informational Macromol., New York, 451.
Nirenberg M. W., Matthaei J. H., Jones O. W., Martin R. G., Barondes S. H. (1963), Fed. Proc., **22**, 55.

Scanned with OKEN Scanner

Schuster H., Schramm G. (1958), Z. Naturforsch., **13** *b*, 697.
Schuster H., Schramm G., Zillig W. (1956), Z. Naturforsch, **11** *b*, 339.
Schwerdt C. E. (1957), *Cellular biology. Nucleic acids and virus*, New York Acad. Sci., New York.
Schwerdt C. E., Schaffer F. L. (1955), Ann. N. Y. Acad. Sci., **61**, 740.
Siegel A., Wildman S. G., Ginoza W. (1956), Nature, **178**, 1 117.
Siegel A., Ginoza W., Wildman S. G. (1957), Virology, **3**, 197.
Sokol F., Szurman J. (1959), Acta virologica, **3**, 175.
Sokol F., Schramek S., Sponar J. (1963), Biochem. Biophys. Res. Comm., **12**, 21.
Sokol F., Schramek S. (1964), Acta virologica, **8**, 193.
de Somer P., Prinzie A., Denys A., Schonne E. (1962), Virology, **16**, 63.
Spiegelman S., Halvarson H. O., Ben-Ishai R. (1955), în *Amino acid metabolism*, John Hopkins University Press.
Spirin A. S. (1965), Vestnik Akad. Nauk SSSR, **4**, 51.
Sprunt K., Redman M. W., Alexander H. E. (1959), Proc. Soc. exp. Biol. Med., **101**, 604.
Sprunt K., Redman M. W., Koenig W. M., Alexander H. E. (1960), Proc. Soc. exp. Biol. Med., **103**, 306.
Sprunt K., Koenig S., Alexander H. E. (1961 *a*), Proc. Soc. exp. Biol. Med., **108**, 755.
Sprunt K., Koenig S., Alexander H. E. (1961 *b*), Virology, **13**, 135.
Stanley W. M. (1935), Science, **81**, 644.
Stanley W. M. (1939), J. biol. Chem., **129**, 405.
Takahaschi W. N., Ishii M. (1953), Amer. J. Botany, **40**, 85.
Terada M. (1958), Congr. IV Intern. Micr. Electr. Berlin, **2**, 115.
Tissières A., Schlesinger O., Gros F. (1960), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **46**, 1 450.
Tissières A., Hopkins J. W. (1961), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **47**, 2 015.
Tobey R. A. (1964), Virology, **23**, *1*, 10, 23.
Tovarnitki V. L. (1950), Usp. biol. himii, **1**, 143.
Tovarnitki V. L., Tihonenko I. T. (1960), Usp. sovr. biol., **49**, 19.
Tsugita A. H., Fraenkel-Conrat H. (1962), J. mol. Biol., **4**, 73.
Tsugita A. H., Fraenkel-Conrat H., Nirenberg M. W., Matthaei J. H. (1962), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **48**, 846.
Ugoleva N. A., Diskina S. R., Cherbukina N. V., Nosacheva A. D., Slavko T. (1964), Vopr. virusol., **2**, 184.
Volkin E., Astrachan L. (1956), Virology, **2**, 148.
Warner J. R., Knopf P. M., Rich A. (1963), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **49**, 122.
Watson J. D. (1963), Science, **140**, 3 562.
Wecker E. (1959 *a*), Virology, **7**, 241.
Wecker E. (1959 *b*), Z. Naturforsch., **14** *b*, 370.
Wecker E., Schäfer W. (1957), Z. Naturforsch., **12** *b*, 415.
Weinstein I. B., Schechter A. M. (1962), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **48**, 1 686.
Weiss S. B., Gladstone L. (1959), J. Amer. Chem. Soc., **81**, 4 118.
Weiss S. B., Nakamoto T. (1961), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **47**, 694.
Welkie G. W. (1959), Phytopatol., **49**, 114.
Wittmann H. G. (1962), Z. Vererbungslehre, **3**, 93.
Wood W. B., Berg P. (1962), Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **48**, 94.
Zillig W., Schäfer W., Ullmann S. (1955), Z. Naturforsch., **10** *b*, 199.
Zinder N. D. (1963), Simp. Inform. Macromol., Academic Press, New York, p. 224.
Zubay G. (1963), Science, **140**, 3 571.

Scanned with OKEN Scanner

APENDIX

Metode de dozare a acizilor ribonucleici

De obicei dozarea ARN se bazează fie pe specificitatea reacţiei de culoare pe care riboza din molecula sa o dă cu orcinolul, fie pe determinarea cantitativă a fosforului. În ceea ce priveşte prima variantă, trebuie menţionat că metoda poate fi supusă unor erori atunci cînd în soluţii se găsesc unele substanţe care interferează cu reactivii pentozei. Prezenţa acestor substanţe poate fi remarcată atunci cînd culoarea obţinută diferă ca nuanţă de aceea observată cu ARN etalon. Pentru a îndepărta erorile provocate de acest tip de interferenţă, se recomandă ca extractele de acizi nucleici să fie dozate prin două sau mai multe metode iar rezultatele obţinute să fie comparate între ele. Calcularea raportului N : P din extractele de acizi nucleici poate de asemenea aduce date utile pentru evaluarea conţinutului în acizi nucleici al unui material biologic. Este de subliniat că numai prin compararea a două sau mai multe metode este posibil să se cunoască exact conţinutul în acizi nucleici prezenţi în extrasele tisulare.

Redăm în cele ce urmează cîteva metode clasice de dozare a ARN. Primele două sînt în special întrebuinţate pentru dozarea acizilor nucleici din ţesuturile animale în timp ce a treia este aplicată mai ales la dozările de acizi nucleici din plante.

METODA SCHMIDT ŞI TANHAUSER (1945)

Acizii nucleici pot fi separaţi de celelalte componente celulare datorită solubilităţii lor preferenţiale în acidul tricloracetic cald. Astfel izolaţi ei sînt apoi dozaţi cantitativ fie prin metoda colorimetrică, ca urmare a reacţiei specifice de culoare a componentei lor pentozice, fie prin dozarea fosforului.

Reactivi. *a*) *Difenil-amina*: un gram de difenil-amină purificată se dizolvă în 100 ml de acid acetic glacial şi 2,75 ml de acid sulfuric concentrat. Se recomandă ca acest reactiv să se prepare înainte de dozare. Difenil-

Scanned with OKEN Scanner

amina comercială se purifică prin distilare și recristalizare cu ajutorul hexanului la fierbere. Se obține un produs alb cristalin.

b) Orcinolul. Un gram de orcinol purificat se dizolvă înainte de întrebuințare în 100 ml de HCl concentrat, care conține 0,5 g de $FeCl_3$. Purificarea orcinolului comercial se face cu benzen la fierbere, decolorare și cristalizare prin adăugare de hexan. Se obține astfel un produs alb.

Metoda de lucru. Este preferabil ca dozarea să se facă imediat după recoltarea țesutului; dacă însă dozarea se face mai tîrziu, este absolut necesară înghețarea lui la —10°C. Țesutul se triturează într-un omogenizator răcit cu gheață; diluția este de 1 : 20 (g/v).

a) Separarea compușilor acido-solubili. Omogenatului i se adaugă acid tricloracetic (ATA) 5—10 % sau acid percloric 0,4 N (1 ml omogenizat cu 2,5 ml ATA). Se centrifughează, iar supernatantul care conține toți compușii acidosolubili se elimină. Această operație se repetă de 3 ori.

b) Separarea fosfolipidelor. Reziduul se extrage cu etanol 80 %, etanol și etanol-cloroform 3 : 1 sau un etanol-eter 1 : 1 la fierbere și apoi cu eter. Extragerea incompletă a lipidelor determină persistența fosforului nespecific în fracțiunea acidului nucleic, ceea ce conduce la erori.

c) Hidroliza alcalină. Reziduul obținut după extracția fosfolipidelor se suspendă în KOH 1 N (1 ml KOH pentru 100 mg de țesut) și se incubează 20 de ore la 37°C.

d) Separarea acidului ribonucleic. Hidrolizatul se neutralizează cu ajutorul HCl 6 N și apoi i se adaugă 2 ml de ATA 5 %. Se centrifughează; supernatantul conține ARN; în precipitat se găsesc ADN și proteinele. Precipitatul se spală de 2 ori cu ATA 5 %. Cantitatea de ARN din extract poate fi determinată fie prin reacția Mejbaum (1938), fie prin dozarea fosforului.

e) Separarea acidului dezoxiribonucleic. Precipitatul rezultat după separarea ARN se extrage timp de 15 min la 90° cu ATA 5 %. Urmează două spălări cu ATA 5 %. Extractele reunite, după centrifugare, conțin ADN. Cantitatea de ADN se obține fie prin analiza fosforului, fie prin metoda Dische (1930).

f) Determinarea acidului ribonucleic. Metoda lui Mejbaum (1939). Un volum din extractul (d), care conține ARN se încălzește cu un volum egal de reactiv orcinol timp de 20 min pe baia de apă la fierbere. Intensitatea coloratiei verzi apărute în urma acestui tratament se citește la lungimea de undă de 660 mμ. În același timp se execută reacția de culoare și pentru cantități cunoscute de acid nucleic standard. Valorile astfel obținute permit a se trasa o curbă etalon cu ajutorul căreia se calculează

apoi cantitatea de ARN cuprinsă în probă. În locul acidului nucleic standard se poate întrebuința o soluție de riboză de o concentrație cunoscută.

g) Determinarea cantității de ADN după Dische (1930). Un mililitru din extractul (*e*) se amestecă cu 2 ml de reactivi Dische (difenil-amina). Totul se încălzește timp de 10 min într-o baie de apă care fierbe. După acest interval de timp, eprubetele se răcesc cu ajutorul unui jet de apă, iar intensitatea culorii albastre se citește la lungimea de undă de 660 mμ. Cantitatea de ADN se calculează cu ajutorul unei curbe standard obținută cu un ADN pur comercial (sau extras în laborator) supus în prealabil aceluiași tratament. În general, există o bună proporționalitate între intensitatea culorii și concentrație pentru cantități cuprinse între 50 și 500 μg de ADN/ml.

METODA SCHNEIDER (1945)

Metoda descrisă de Schneider are același mers al analizei ca și metoda Schimdt și Tanhauser (1945) descrisă mai înainte, pînă la punctul (*c*). De aici încolo, Schneider (1945) tratează reziduul obținut după delipidare cu ATA 5% la 90°C timp de 15 min. În acest fel se extrag ambii acizi nucleici, iar proteinele rămîn insolubile. În urma acestui tratament, acizii nucleici sînt hidrolizați pînă la nucleotide sau baze libere. După centrifugare, cantitatea de acizi nucleici se determină din supernatant pe baza reacției de culoare specifice a pentozei (ARN) și a dezoxipentozei (ADN).

METODA OGUR ȘI ROSEN (1950)

a) Separarea compușilor solubili în alcool. Țesutul proaspăt se introduce în etanol 70—95% la 0°C. Se omogenizează la 4°C într-un omogenizator Potter cu alcool 70%. Se spală încă o dată cu etanol 70%, care conține 0,13 acid percloric. Prin centrifugare se separă compușii acloolosolubili.

b) Separarea compușilor solubili în alcool-eter. Reziduul se extrage cu alcool-eter 3 : 1 la fierbere. Operația se repetă, iar extractele se îndepărtează.

c) Separarea compușilor solubili în acid. Reziduul se extrage repede cu acid percloric (APC) 0,2 N. Operația se repetă și extractele se elimină.

d) Separarea acidului ribonucleic. Reziduul se tratează cu APC N, timp de 18 ore la 4°. Se spală de două ori, iar extractele reunite conțin ARN.

e) *Separarea acidului dezoxiribonucleic.* Reziduul obţinut de la separarea acidului ribonucleic se tratează cu APC 0,5 N la 70° timp de 20 min. Operaţia se repetă, iar extractele se reunesc.

Determinarea celor doi acizi nucleici se realizează în extractele (*d*) şi (*e*).

METODA PRIN DOZAREA FOSFORULUI

Determinarea conţinutului în fosfor a unui acid nucleic presupune stabilirea cantităţii sale de fosfor organic. Acesta se obţine prin diferenţă, scăzînd din fosforul total fosforul anorganic : P organic = P total — P anorganic.

Trebuie precizat că fosforul organic cuprinde la rîndul său două grupe de *compuşi* : *a*) *acidolabili*, adică acei care se hidrolizează complet în prezenţa acizilor (N) la 100°C în timp de 7 min ; ca exemple de substanţe din această grupă pot fi date : ATP, ADP etc. ; *b*) *acidostabili*, compuşii care nu se hidrolizează în condiţiile mai sus amintite ; printre ei pot fi citaţi pentozo-*3'*,*5'*-fosfaţii, polinucleotidele etc.

Determinarea fosforului total (după Cardini şi Leloir, 1957). Peste proba de analizat se adaugă 1 ml de H_2SO_4 5 N. Amestecul se evaporă într-o eprubetă ţinută deasupra unei flăcări. În momentul în care conţinutul devine brun, se răceşte eprubeta şi se adaugă o picătură de HNO_3 2 N. Încălzirea se continuă pînă cînd apare un fum alb. Dacă lichidul nu se decolorează se repetă adăugarea de HNO_3. Excesul de acid azotic influenţează dezvoltarea culorii ulterioare. După răcire se adaugă 1 ml de apă, iar tubul se introduce pentru cinci minute într-o baie de apă care fierbe. În proba astfel mineralizată se determină fosforul după metoda Fiske şi Subbarow (1925).

Determinarea fosforului anorganic (după Fiske şi Subbarow, 1925).

1) *Reactivi* : *a*) acid sulfuric 5 N.

b) molibdat de amoniu 2,5 %.

c) acid azotic 2 N.

d) reactiv reducător ; acesta se poate prepara sub formă de pulbere care se disolvă înainte de întrebuinţare. Soluţia se descompune încet din care cauză nu trebuie folosită mai mult de o săptămînă. Reactivul sub formă de pulbere se prepară amestecînd împreună 0,2 g de acid *1*-amino-*2*-naftol-*4*-sulfonic cu 1,2 g de bisulfit de sodiu şi 1,2 g de sulfit de sodiu. Înainte de analiză se cîntăresc 0,25 g din acest amestec şi se dizolvă în 10 ml de apă.

e) Soluţia standard de fosfor. Se cîntăresc 1,3613 g de K_2HPO_4 p.a. care se disolvă în 1 000 ml de apă, peste care se adaugă apoi cîteva picături

de cloroform şi se păstrează în răcitor. Pentru analiză, soluţia se diluează 1 : 10 ; în acest fel se obţine un micromol (μM) de fosfor într-un ml.

2) *Metoda de lucru.* Probele de analizat se deproteinizează în prealabil fie cu acid tricloracetic 5—10 %, fie cu acid percloric 8 %. Peste probele standard, cît şi peste cele de analizat, care trebuie să conţină între 0,1 şi 1 μM fosfat, se adaugă 1 ml de H_2SO_4 şi apoi din soluţia de molibdat. După amestecare se adaugă 0,1 ml reactiv reducător. Volumul soluţiei se completează la 10 ml. Se amestecă din nou soluţiile şi după 10 minute se citeşte absorbanţa la lungimea de undă de 660 mμ.

Trebuie semnalat faptul că silicaţii şi arseniaţii dau şi ei o culoare albastră în condiţiile acestei metode.

Cînd se urmăreşte dozarea fosfocreatinei probele se lasă 20 min cu H_2SO_4 şi molibdat, iar apoi se adaugă agentul reducător. În acest timp toată fosfocreatina se hidrolizează.

Determinarea fosfaţilor acidolabili. Peste acidul sulfuric 5 N adăugat (după indicaţiile metodei de lucru Fiske-Subbarow), se adaugă apă pînă la 5 ml, astfel încît soluţia de acid sulfuric se diluează la 1 N. Probele se încălzesc apoi timp de 7 min într-o baie de apă care fierbe. După răcire probele sînt analizate după metoda de determinare a fosforului anorganic.

DETERMINAREA AZOTULUI TOTAL (METODA KJELDAHL)

Principiu : Azotul total din proba de analizat se transformă prin mineralizare în amoniac, care, după distilare, se titrează iodometric. Reacţiile principale sînt următoarele :

$$\text{Substanţa organică} + H_2SO_4 \xrightarrow{\text{catalizatori}} NH_4HSO_4 + CO_2 + H_2O$$

$$NH_4HSO_4 + 2NaOH \rightarrow Na_2SO_4 + H_2O + NH_3$$

$$NH_3 + KH(IO_4)_2 \rightarrow KIO_4 + NH_4IO_4$$

Reactivi : *a*) Amestec pentru mineralizare : 3 volume de H_2SO_4 conc. şi 1 volum de acid fosforic.

b) Persulfat de potasiu reactiv pentru kjeldahlizare.

c) Zaharoză p. a.

d) NaOH 10 %.

e) Tiosulfat de sodiu aprox. 0,011 M (se disolvă 2,75 g de tiosulfat de sodiu pentahidratat într-un litru de apă distilată la care se adaugă 3 picături de cloroform).

f) $KH(IO_4)_2$ 0,05 M : se dizolvă în apă distilată 19 500 g de $KH(IO_4)_2$ şi se aduce la 1 litru. Pentru analiză se întrebuinţează soluţia diluată de cinci ori, adică 0,01 M.

g) Indicator de amidon 1%; se face mai întîi o pastă din 500 mg de amidon solubil cu puţină apă şi aceasta se adaugă peste 50 ml de NaCl 20% (g/v) care fierbe.

h) Iodură de potasiu p. a.

Mineralizarea. Toate operaţiile de mineralizare se efectuează sub nişă. Proba de analizat, cu un conţinut de 0,1 — 1,0 mg de azot, cîntărită sau pipetată, se introduce într-un balon Kjeldahl de 10 ml; peste ea se adaugă 1 ml amestec de mineralizare şi o perlă curată de sticlă Pyrex. În cazul mineralizării substanţelor care conţin azot în cicluri aromatice sau în eterocicluri, în balon se mai adaugă 100 mg zaharoză. Apoi excesul de apă se îndepărtează cu ajutorul unei flăcări mici sau într-un cuptor la 125°C. În continuare, se răceşte balonul şi se adaugă 100 mg de persulfat de potasiu şi 5 pînă la 8 picături de apă distilată. Se aşează o pîlnie de filtrare peste balon şi se continuă încălzirea pînă cînd începe să se degaje un fum alb. În cazul în care proba nu s-a clarificat se repetă adaosul de persulfat şi se continuă încălzirea. În final, se adaugă 50 mg de persulfat de potasiu împreună cu 5—8 picături de apă distilată, şi se aşează pe o baie de nisip la 375°. După cinci ore de încălzire la această temperatură se răceşte balonul la temperatura camerei. În urma acestui tratament operaţia de mineralizare se consideră terminată.

Distilarea. De obicei se realizează cu ajutorul aparatului de microdistilare de tip Parnas-Wagner (sau altele asemănătoare).

Substanţa mineralizată răcită se introduce în aparatul de distilare. Balonul Kjeldahl se spală de cinci ori cu cîte 1 ml de apă distilată peste care s-a adăugat puţină fenol-ftaleină ca indicator. Toate apele de spălare se introduc în distilator. La extremitatea refrigerentului se aşează un flacon Erlenmeyer de 50 ml în care se găsesc 10 ml de biiodat de potasiu 0,01 M. Vîrful refrigerentului trebuie să se găsească în interiorul acestei soluţii pentru a evita pierderile de NH_3. În balonul de distilare se adaugă apoi NaOH 10% pînă cînd proba devine alcalină. Se închide aparatul şi se începe distilarea prin antrenare, cu ajutorul vaporilor de apă din generator. Distilarea durează 6—10 minute, în care timp distilă aproximativ 15 ml de lichid (inclusiv amoniacul).

După acest timp flaconul Erlenmeyer cu soluţia de biiodat se coboară astfel încît vîrful refrigerentului să se găsească la aproximativ 2 cm deasupra nivelului lichidului. Se spală vîrful refrigerentului cu puţină apă şi se continuă distilarea încă două minute.

Titrarea. Pentru aceasta se adaugă aproximativ 40 mg de KI în flaconul Erlenmeyer cu soluţia de biiodat de două ori distilat. Iodul care se eliberează se titrează cu $Na_2S_2O_3$ 0,011 M. Aproape de punctul final, se adaugă o picătură de amidon şi se continuă titrarea pînă la apariţia culorii albastre persistente.

Paralel se titrează 10 ml de biiodat de potasiu pentru proba martor.

Scanned with OKEN Scanner

Calculul. Cantitatea de azot (în mg) din probă se obţine din următoarea relaţie :

$$\text{mg N} = \frac{a - b}{a} \times 10 \; N \times 14{,}008$$

în care a reprezintă volumul în mililitri de tiosulfat de sodiu întrebuinţat pentru titrarea probei martor ; b numărul de mililitri de tiosulfat de sodiu pentru proba analizată, iar N normalitatea soluţiei de biiodat de potasiu în raport cu H^+.

Metode de extracţie a acidului ribonucleic total

EXTRACŢIA ACIDULUI RIBONUCLEIC TOTAL

Principiul şi avantajele extracţiei cu fenol au fost discutate în alt capitol ; în cele ce urmează vom reda cîteva metode de extracţie a ARN adaptate după metoda lui Gierer şi Schramm (1956), în care se utilizează fenolul.

Descriem întîi metoda pe care o întrebuinţăm în mod curent în laboratorul nostru pentru extracţia unor ARN tisulari şi virali.

Reactivi : 1) Soluţie de NaCl 0,14 M (clorură de sodiu Merck p.a.)

2) Eter *pro narcosi* proaspăt bidistilat (operaţia de distilare şi bidistilare se execută cu 1—2 ore înainte de extracţie). După distilare, eterul se ţine la +4° la întuneric. Atragem atenţia asupra necesităţii utilizării eterului *pro narcosi*, în special în extracţiile în care se urmăreşte obţinerea unui ARN viral infectant. Oricare alt tip de eter, chiar *pro analisi* şi chiar proaspăt distilat, inactivează acizii nucleici infectanţi.

3) Fenol (Merck) saturat cu apă. Pregătirea soluţiei fenolice se face astfel : 90 g fenol proaspăt bidistilat se dizolvă în 10 ml apă bidistilată şi, după solvirea completă, se adaugă încă 100 ml apă bidistilată. Se agită fazele în pîlnia de separare şi se lasă în repaus 24 de ore la întuneric. După separarea completă a straturilor, stratul inferior se colectează într-o sticlă brună ; fenolul astfel saturat se conservă la +4° şi poate fi utilizat maximum 15—20 de zile. Puritatea fenolului este extrem de importantă, în special în cazul extracţiei acizilor nucleici virali, înzestraţi cu proprietăţi infectante. Portocală şi Andreescu (1961) au arătat că unele produse sînt impurificate cu substanţe care au rol inhibant faţă de această categorie

Scanned with OKEN Scanner

de acizi nucleici, substanţe care chiar după distilare rămîn în fenol în cantităţi apreciabile. Un fenol de această calitate va extrage din virusuri un acid nucleic lipsit de activitate.

Datorită scăderii solubilităţii fenolului la +4°, în timpul păstrării soluţia iniţial limpede şi omogenă se separă în două faze. De aceea, întotdeauna înainte de întrebuinţare, conţinutul flaconului trebuie agitat pentru omogenizare, după care se prelevă cantitatea necesară de fenol emulsionat.

Dozarea soluţiei astfel preparată a arătat că ea conţine o cantitate de aproximativ 80 g fenol la 100 ml.

4) Azot sub presiune, în butelie obişnuită.

Reactivii, ca şi ţesuturile din care se extrag ARN sînt răcite în prealabil la +4°. Toate operaţiile de extracţie se execută la limite de temperatură cuprinse între 2° şi 4°.

Metoda de lucru : În unele cazuri speciale, şi anume atunci cînd materialul din care se extrage ARN este bogat în lipide, extracţia fenolică trebuie să fie precedată de o delipidare cu eter. Această tehnică a fost preconizată pentru prima oară de Portocală, Boeru şi Samuel (1959), pentru extracţia ARN infectant din virusurile liponucleoproteice ca virusul gripal şi Newcastle.

a) *Delipidarea prealabilă şi omogenizarea.* Imediat după recoltare, ţesutul din care trebuie extras ARN se cîntăreşte şi se triturează timp de aproximativ 20 min cu nisip de mare într-un mojar răcit. Mojaratul se diluează cu o soluţie de NaCl 0,14 M, în proporţie de 5%.

Omogenatul se clarifică prin centrifugare timp de 30 min la 10 000 t/m într-o centrifugă cu răcire la 0°C. Se decantează lichidul supernatant, care serveşte la extracţie, în timp ce sedimentul se îndepărtează, el fiind constituit din resturile celulare.

Peste suspensia de ţesut din care urmează să se extragă ARN se adaugă eter bidistilat şi răcit, în cantitate de 7—10 ori volumul suspensiei apoase. Se agită energic timp de 2 minute la rece, se lasă în repaus cîteva minute şi apoi se decantează cu ajutorul trompei de vid stratul superior constituit din eter. Operaţia de delipidare se repetă de 3 ori. După ultima decantare, soluţia apoasă se centrifughează la rece (+4°) timp de 5—10 min la 500 t/m pentru îndepărtarea completă a eterului.

Se măsoară volumul soluţiei astfel obţinute într-un cilindru gradat răcit în prealabil şi se transvazează într-o fiolă de centrifugă.

b) *Tratarea cu fenol.* În aceeaşi eprubetă se adaugă un volum egal din soluţia saturată de fenol (omogenizată înainte de pipetare). Se închide eprubeta cu un dop de cauciuc învelit cu celofan şi se agită energic 10 min la rece. Urmează apoi o centrifugare de 5 min la 3 000 t/m, după care se decantează stratul fenolic (cel inferior). În eprubetă rămîne soluţia apoasă care conţine ARN şi proteina. Aceasta din urmă, se prezintă sub forma

unui strat alb, de grosime variabilă, situat înainte de decantarea fenolului între cele două faze; el este constituit din proteina denaturată şi precipitată. Peste soluţia apoasă se adaugă un volum egal de soluţie fenolică şi se repetă extracţia prin agitare la rece timp de 5 min. Se centrifughează şi se decantează ca mai sus. După a treia extracţie fenolică, tot de 5 min, realizată în aceleaşi condiţii, se recoltează prin pipetare faza apoasă, separată prin centrifugare.

c) *Îndepărtarea fenolului.* Fenolul din soluţia apoasă care conţine ARN este îndepărtat prin trei extrageri succesive cu un volum total de 100 ml eter. Eterul este îndepărtat după fiecare extracţie prin decantare cu ajutorul trompei de vid.

d) *Îndepărtarea eterului.* După ultima decantare, preparatul este barbotat cu azot în scopul înlăturării complete a eterului.

Toate operaţiile, începînd cu delipidarea şi extragerea fenolică, trebuie să dureze circa 75 min, avînd grijă deosebită ca temperatura să nu depăşească limitele indicate (maxim +4°).

Determinarea spectrofotometrică a acidului ribonucleic. Concentraţia ARN rezultat în urma extracţiei cu fenol se determină de obicei atît pe cale chimică, prin metoda cu orcinol, cît şi prin metoda spectrofotometrică.

Aceasta din urmă presupune mai întîi aprecierea calitativă a produsului prin trasarea curbei sale de adsorbţie în ultraviolet între 220 şi 300 mμ (curba de absorbţie tipică a ARN prezintă un maxim la 260 ± 2 mμ şi un minim în jurul valorii de 234 mμ).

Se consideră că extractul obţinut conţine ARN pur dacă valoarea raportului absorbţiei A_{280}/A_{260} este cuprinsă între 0,45 şi 0,49. Creşterea raportului spre unitate este o indicaţie că produsul este contaminat cu proteină (vezi mai departe dozarea proteinei).

În al doilea rînd, determinarea cantitativă a ARN prin această metodă necesită în prealabil trasarea unei curbe care să reprezinte variaţia absorbţiei maxime în funcţie de concentraţie a unei probe de ARN etalon. Concentraţia probei extrase se determină prin citirea directă a valorii absorbţiei maxime, pe curba etalon.

EXTRACŢIA ŞI PURIFICAREA ARN VIRAL CU AJUTORUL BENTONITEI

(după Fraenkel-Conrat, Singer şi Tsugita, 1961)

Încă de la primele experienţe, autorii au constatat că infectivitatea ARN în comparaţie cu aceea a virusului este mult mai mică. În cursul cercetărilor întreprinse asupra acestui aspect al problemei, s-a dovedit

că bentonita protejează, stabilizează şi potenţează infectivitatea ARN extras din VMT. În afară de aceasta, bentonita mai are proprietatea de a inhiba RN-azele şi de a reţine proteinele. Extracţia ARN infectant în prezenţa bentonitei are prin urmare avantajul de a conduce la obţinerea unui ARN înzestrat cu o activitate mult mai ridicată şi cu un conţinut în proteine extrem de mic (numai 0,04%).

Metoda de lucru. Suspensiile de bentonită se prepară astfel: 2 g de bentonită comercială pulverizată se suspendă în 40 ml de apă şi se centrifughează la 2 500 t/m 15 min. Supernatantul obţinut este centrifugat 20 min la 8 600 t/m. Sedimentul obţinut la centrifugarea de 2 500 t/m este resuspendat şi ţinut în versen 0,1 M pH 7 timp de 48 ore la 25° şi din nou centrifugat la aceleaşi turaţii. Sedimentul de la 8 600 t/m se suspendă în acetat 0,01 M pH 6 şi se centrifughează din nou la 8 600 t/m. În continuare, sedimentul se reia în tampon acetat, în aşa fel ca să se obţină o concentraţie de bentonită de 1,5—5% (determinată prin greutatea uscată).

Se amestecă 100 mg de virus al mozaicului tutunului în 4 ml de apă, cu o suspensie de 100 mg bentonită, 0,04 ml de versen 0,1 M pH 7 şi 4 ml soluţie saturată de fenol redistilat. Amestecul se agită viguros timp de 15 min la 25°.

După separarea fazelor prin centrifugare, faza apoasă este din nou agitată cu fenol (2 ml) şi separată prin centrifugare. Eliminarea fenolului se face prin trei extracţii cu eter. Acidul ribonucleic este precipitat cu 2 volume de etanol la care se adaugă o picătură pentru fiecare mililitru dintr-o soluţie de acetat de sodiu 3 M. Precipitatul se dizolvă în apă şi apoi se ultracentrifughează (cu refrigerare) la 40 000 t/m timp de 2 ore, pentru a îndepărta bentonita.

Acidul ribonucleic este din nou precipitat cu etanol, reprecipitat cu ajutorul NaCl 1—1,2 M la 0°C. Procesul este continuat de un ciclu adiţional de precipitare cu alcool şi ultracentrifugare.

Preparatele de ARN astfel obţinute nu conţin Si sau Al. Încercările de infectivitate cu acest ARN au dat 41 de leziuni la concentraţia de 0,025 μg/ml, în timp ce 0,25 μg/ml de ARN obţinut după tehnica obişnuită au dat 45 de leziuni. Se poate conchide în urma acestor cercetări că infectivitatea ARN extras în prezenţa bentonitei este de aproximativ 10 ori mai mare decît a aceluiaşi produs extras în absenţa bentonitei.

EXTRACŢIA ACIDULUI RIBONUCLEIC MONO- ŞI BICATENAR DINTR-UN ŢESUT

după metoda Homma şi Graham (1963) modificată de Pons (1964)

Metoda a fost întrebuinţată pentru extracţia acidului ribonucleic infectant mono- şi bicatenar din celulele HeLa infectate cu virusul poliomielitic.

Scanned with OKEN Scanner

Metoda de lucru. Peste cultura congelată şi decongelată se adaugă bentonită pînă la concentraţia finală de 0,15% şi un volum egal dintr-o soluţie, compusă din dodecil-sulfat de sodiu recristalizat 0,5%, LiCl 0,14 M şi $MgSO_4$ 10^{-3} M în tampon acetat pH 4,9. Imediat se adaugă un volum egal de fenol redistilat saturat cu apă şi amestecul se agită puternic timp de două minute. Pentru a îndepărta acidul dezoxiribonucleic, amestecul se încălzeşte la 60° timp de 3 min şi apoi se răceşte într-un vas cu gheaţă sfărîmată. Fazele se separă prin centrifugare la 7 000 t/m timp de 5 min. Peste faza apoasă se adaugă şase volume de alcool rece şi amestecul este păstrat timp de o oră la +4°C.

Acidul ribonucleic astfel precipitat se colectează prin centrifugare la turaţie mică, se redizolvă în tampon (LMT : LiCl 0,14 M, $MgSO_4$ 10^{-3} M în Tris-HCl 10^{-2} M pH 7,6) şi se reprecipită cu şase volume de etanol. După două ore la +4°, ARN se colectează la fel ca mai sus, se disolvă în LMT şi se păstrează la — 70°C.

Pentru obţinerea unei solubilizări totale, este uneori necesar ca precipitatul, împreună cu tamponul LMT, să fie încălzit la 30°.

EXTRACŢIA ACIDULUI RIBONUCLEIC SOLUBIL

Extracţia ARN-*S* din *E. coli* (Zubay, 1962). Cultura de *E. coli*, preparată după metoda descrisă de Littauer şi Kornberg (1957), poate fi păstrată înainte de întrebuinţare îngheţată la —20°C. În cazul în care cultura este conservată în acest mod înainte de extracţie ea trebuie decongelată timp de 3 ore la 5°C. Este totuşi preferabil ca extracţia să se facă din bacterii proaspete, neînghetate. Toate operaţiile se execută la 5°C, cu excepţia celor menţionate mai jos. Etapele principale pentru prepararea unui ARN-*S* sînt : extracţia cu fenol după metoda lui Kirby prin care se înlătură toate materialele nespecifice ; o extracţie cu NaCl 1 M care separă ARN-*S* de cel înalt polimerizat şi de urmele de proteine ; o fracţionare cu izopropanol, care separă ARN-*S* de ADN şi de fracţiunile de ARN care sînt inactive faţă de aminoacizi.

Tehnica de lucru. Două kilograme de pastă de bacterii se suspendă în 4 litri de acetat de magneziu 0,01 M + tampon Tris 0,001 M pH 7,4 şi apoi se distribuie în mod egal în opt sticle de 2 litri. Se adaugă aproximativ 430 ml de fenol redistilat (soluţie 88%) în fiecare sticlă şi se agită puternic timp de o oră. Amestecul se centrifughează la 18 000 *g* timp de 30 min. Se decantează soluţia supernatantă, care trebuie să fie limpede, şi care conţine acidul nucleic. Acesta este precipitat cu 20% soluţie 0,1 M acetat de potasiu şi 2 volume de alcool absolut. În acest stadiu al preparării, produsul poate fi păstrat 36 de ore. Precipitatul este colectat prin centrifugare la 5 000 t/m. Supernatantul se decantează şi peste precipitat se adaugă 2 l de soluţie răcită de NaCl 1 M. Se agită viguros timp de o oră pentru a dispersa precipitatul, iar suspensia este centrifugată 30 min la

Scanned with OKEN Scanner

15 000 *g*. Sedimentul obţinut este reextras cu 1 l din aceeaşi soluţie de NaCl, şi din nou centrifugat. Supernatantele rezultate din cele două extracţii cu NaCl sînt reunite şi tratate cu 2 volume de etanol. Se repetă precipitarea cu etanol.

În procedeul preconizat de Zubay, ARN este incubat la un pH ridicat pentru îndepărtarea aminoacizilor din poziţia terminală a ARN-*S*, legaţi de adenozină. Precipitatul obţinut după cum s-a arătat mai sus este suspendat în 200 ml de tampon glicocol 0,2 M la pH 10,3 şi incubat la 36°C timp de 3 ore. Suspensia se aduce la concentraţia 0,4 M NaCl şi ARN precipitat cu 2 volume de alcool. Precipitatul se dizolvă în 1,4 l soluţie de acetat de sodiu 0,3 M cu pH 7,0, la care se adaugă 0,54 volume de alcool izopropilic. Adăugarea acestui din urmă reactiv se face în porţiuni mici şi sub agitare continuă. Temperatura se aduce la 20°C şi precipitatul care se obţine se separă prin centrifugare la 8 000 *g* timp de 5 min. Precipitatul se redizolvă în 0,7 l de acetat de sodiu la pH 7,0 şi se adaugă 0,54 volume de alcool izopropilic (ca mai sus).

Precipitatul se îndepărtează prin centrifugare. Supernatantele reunite sînt tratate cu 745 ml alcool izopropilic. Precipitatul rezultat, care conţine ARN-*S*, este colectat prin centrifugare la 5°C, dizolvat în 150 ml de apă şi dializat faţă de apa distilată peste noapte la 5°C. Soluţia de ARN-*S* dializată se păstrează în stare îngheţată sau liofilizată.

Randamentul în ARN-*S* este de 5 g la 2 kg de cultură de *E. coli*.

Prepararea ARN-S selectiv combinat cu leucina. Amestecul de incubaţie conţine 20 ml de ARN-*S* 1—2%, 0,3 ml de tampon Tris 1 M cu pH 7,4, 0,3 ml de $MgCl_2$ 1 M, 1,2 ml de ATP 0,1 M cu pH 7,0, 3,0 ml de fosfoenol-piruvat 0,05 M, 1,2 ml de 2μM L-leucină (C^{14}), 0,1 ml de piruvat-kinază, 1 ml de extract enzimatic cu D.O. 7,2 la 280 mμ sau o cantitate echivalentă (vezi mai departe prepararea extractului enzimatic).

Amestecul se ţine 10 min la 36°. Se adaugă 10 ml de apă şi 75 ml de fenol redistilat în soluţie saturată de 88% şi se agită viguros 6 min. Supernatantul se separă prin centrifugare şi decantare.

Acidul ribonucleic se precipită prin adăugare de 2 volume de etanol şi 0,1 volume soluţie de NaCl 1 M. Precipitatul se colectează prin centrifugare, se spală de 3 ori cu acetat de sodiu 1M cu pH 5,0 şi se reprecipită cu alcool. Ultimul precipitat se dizolvă în acetat de sodiu 0,05 M cu pH 5,0 şi se îngheaţă sau se întrebuinţează ca atare.

Prepararea extractului enzimatic necesar cuplării aminoacidului cu ARN-S. Toate operaţiunile se fac la 5° C. Circa 30g de pastă de *E. coli* proaspătă sau îngheţată se amestecă cu o cantitate egală în volum de pulbere de aluminiu şi se mojarează 10—15 minute. La suspensia rezultată se adaugă 60 ml de acetat de magneziu 0,01 M + Tris 0,001 M cu pH 7,4 şi 4 μg/ml de DN-ază.

Scanned with OKEN Scanner

Membranele bacteriene sînt îndepărtate prin centrifugare la 17 000 *g* timp de 15 min. Supernatantul se centrifughează în continuare la 78 000 *g* timp de 150 min.

Supernatantul rezultat se decantează şi se dializează 8 ore faţă de o soluţie tampon fosfat de potasiu 0,02 M cu pH 7,7. Apoi 15 ml de extract se trec pe coloană de cromatografie cu dimensiile de 1,2 × 30 cm, încărcată cu DEAE-celuloză. În prealabil, coloana se echilibrează cu tampon fosfat pH 7,7. Enzima se eluează de pe coloană cu o soluţie de NaCl 0,25 M + 0,02 M tampon fosfat de potasiu cu pH 7,7. Fracţiunile se colectează în porţiuni de 5 ml şi fracţiunea cu densitatea optică cea mai mare se foloseşte pentru cuplarea ARN-*S* cu aminoacidul.

Prepararea ARN-S dialdehidic. Se adaugă 2 ml de $NaIO_4$ 0,2 M în acetat de sodiu 0,1 M, la 2 ml de ARN-*S* 1%. Se lasă 30 min la temperatura camerei, după care se adaugă 0,7 ml de NaCl 4 M. Acidul ribonucleic se precipită prin adăugarea de 9,4 ml de etanol. Precipitatul se colectează prin centrifugare şi se resuspendă în acetat de sodiu 1 M cu pH 5,0. Acidul nucleic se reprecipită prin adăugarea a 2 volume de etanol şi se centrifughează din nou. Procesul se repetă de două ori şi precipitatul final se reia în formiat de sodiu 3 M şi 0,5% volume de *2,2',2''*-nitrilotrietanol, ajustat la pH 8,2 cu acid acetic. Această soluţie se întrebuinţează imediat după preparare.

Extracţia ARN-*S* din ţesuturi animale. Pentru extracţia ARN-*S* din ţesuturi animale Popa şi Lăcătuş (1966) au modificat metoda lui Zubay (1962) astfel: după recoltarea ţesutului acesta se omogenizează într-un mojar în prezenţa unei cantităţi duble de tampon pH 7,4 de Tris-HCl 0,001 M conţinînd 0,01 M acetat de magneziu. Suspensia rezultată se extrage cu 0,6 volume de fenol 88% agitîndu-se continuu amestecul timp de o oră la temperatura camerei .Urmează o centrifugare la +4° timp de 30 de min la 1 150 *g*. În faza apoasă separată se adaugă un volum egal de tampon Tris-HCl şi totodată acetat de sodiu solid astfel ca soluţia să ajungă la concentraţia de 2%. Soluţia se precipită cu două volume de alcool etilic de 95%. După o oră de păstrare la temperatura camerei amestecul se centrifughează la temperatura camerei timp de 10 min la 1 150 *g*.

Precipitatul se reia cu un volum de acetat de sodiu 0,3 M egal cu al materialului iniţial. Se adaugă apoi 0,5 volume de alcool izopropilic şi se lasă o oră la 20°C. În acest fel se precipită ARN înalt polimerizat şi ADN. După centrifugarea timp de 10 min a produsului la 16 000 *g* şi 20°C, supernatantul rezultat se răceşte la +4°C iar peste el se adaugă din nou 0,5 volume de alcool izopropilic. Amestecul se ţine o oră la +4° timp în care se precipită ARN-*S*. Sedimentul obţinut după o centrifugare de 10 min la 16 000 *g* se dizolvă în NaCl 0,05 M şi se introduce într-o coloană de DEAE-celuloză cu dimensiunile de 12 × 1,5 cm. Coloana se spală la început cu 100 ml de NaCl 0,2 M după care urmează eluţia ARN-*S* cu NaCl 0,62 M. ARN-*S* este eluat în aproximativ 40 de ml din această

soluţie. Controlul eluţiei realizîndu-se la spectrofotometru, se recoltează numai porţiunea în care se elueză ARN-*S*. Aceasta se precipită apoi cu două volume de alcool etilic de 95% obţinîndu-se un precipitat care conţine ARN-*S*. Îndepărtarea acizilor aminaţi legaţi de ARN-*S* se realizează prin incubarea la 37°C a produsului într-un tampon de glicocol 0,2 M cu pH 10,3 după tehnica descrisă de Zubay (1962). Din 4 g de ficat de şoarece se obţin aproximativ 5 mg ARN-*S*.

Analiza acidului ribonucleic extras

Determinarea conţinutului în ARN şi ADN din extractele de acizi nucleici, după Mahler şi Pereira 1962. Metoda aceasta este o variantă a celei preconizate de Burton (1955 şi 1956). Probele se amestecă la 0° cu un volum egal de $HClO_4$ 0,5 N şi se menţin apoi timp de o oră la această temperatură. Suspensiile se centrifughează la 2 000 *g* (15 min şi 0°C). Supernatantele se decantează iar precipitatele se resuspendă în 1 ml de $HClO_4$ 1 N (30 min la 70°C). Toate extractele se reunesc, iar soluţia rezultată se întrebuinţează pentru determinarea ambilor acizi nucleici.

Dozarea ARN se face prin metoda cu orcinol (Mejbaum) întrebuinţînd o soluţie de D-riboză pentru martor. Corecţia pentru dezoxiriboză se face măsurînd absorbanţa unor cantităţi cunoscute de ADN adăugate în probele de analizat. Dozarea ADN se realizează cu ajutorul reacţiei cu difenil-amină, Dische.

Determinarea conţinutului în proteine

Dozarea proteinelor după Lowry şi colab. (1951):

a) *Reactivi*: *1*) Reactivul A: Na_2CO_3 2% în NaOH 0,1 N.

2) Reactivul B: $CuSO_4$ 5 H_2O 0,5% în tartrat de sodiu sau potasiu, soluţii 1%.

3) Reactivul C: soluţie alcalină de cupru (se amestecă 50 ml de reactiv A cu 1 ml de reactiv B, se decantează după o zi).

4) Reactivul D: 50 ml de Na_2CO_3 2% şi 1 ml reactiv B; se decantează după o zi.

5) Reactivul E: constă din reactivul Folin-Ciocîlteu diluat astfel încît aciditatea lui să corespundă la 1 N.

b) *Prepararea reactivului Folin-Ciocîlteu.* Amestecul care conţine 100 g tungstat de sodiu cu 25 g molibdat de sodiu ($2H_2O$), 700 ml de apă, 50 ml de acid fosforic 85% şi 100 ml de acid clorhidric concentrat

se ţine la reflux timp de 10 ore într-un balon de 1,5 l. Se adaugă apoi 150 g sulfat de litiu, 50 ml apă şi cîteva picături de brom. Amestecul se fierbe 15 min fără condensator pentru a îndepărta excesul de brom. Se răceşte, se diluează la 1 litru, apoi se filtrează. Reactivul nu trebuie să prezinte o tentă verde.

Aciditatea reactivului se determină prin titrare cu NaOH 1 N întrebuinţînd fenol-ftaleina ca indicator.

c) *Metoda de lucru.* Într-o eprubetă în care se găsesc 0,2 ml din probă cu un conţinut de 5—100 μg de proteină se adaugă 1 ml de reactiv C. Se amestecă bine şi se lasă 10 minute sau mai mult la temperatura camerei. Se adaugă apoi 0,10 ml de reactiv E, amestecînd rapid. Culoarea albastră care se dezvoltă se citeşte la un colorimetru sau spectrofotometru după 30 min sau mai mult. Concentraţiile mici de proteine se citesc la o lungime de undă de aproximativ 750 mμ. În cazul concentraţiilor scăzute de proteine (sub 25 mμ/ml), se lucrează cu 0,5 ml (în loc de 0,2 ml) de soluţie de proteină, care se amestecă cu 0,5 ml de reactiv C, a cărui concentraţie se dublează. Procedeul de lucru rămîne în continuare acelaşi.

Cantitatea de proteină se calculează cu ajutorul unei curbe standard obţinută cu albumină bovină cristalizată.

Metoda Lowry modificată de Miller (1953). În tuburi colorimetrice de 14 mm diametru exterior se adaugă 1 ml reactiv cupru-alcalin (10 p. Na_2CO_3 10% în 0,5 N NaOH şi o parte soluţie $CuSO_4$ 0,5% în tartrat de potasiu 1%) şi 1 ml din probă. După 10 min se adaugă 3 ml reactiv Folin-Ciocîlteu diluat 1 :11. Se încălzeşte 10 min la 50°C. După răcire la temperatura camerei probele se citesc la lungimi de undă de 540—750 mμ.

Reproductibilitatea între 0,04—0,2 mg este de ± 2%.

Determinarea spectrofotometrică a proteinei. Una din principalele metode de caracterizare a unei probe de acid nucleic constă în determinarea spectrului de absorbţie în lumină ultravioletă. Curba de absorbţie obţinută ne oferă printre altele şi posibilitatea cunoaşterii purităţii aproximative a preparatului examinat. După cum este cunoscut, proteinele prezintă un maxim de absorbţie la 280 mμ, datorită în special prezenţei triptofanului şi a tirozinei în moleculele lor. În comparaţie cu acizii nucleici (care au maximul de absorbţie la aproximativ 260 mμ), absorbţia proteinelor în ultraviolet este mult mai slabă. Totuşi, prezenţa lor în preparatele de acizi nucleici se poate aprecia spectrofotometric după valoarea absorbţiei lor la 280 mμ. Astfel, o probă de acid nucleic contaminată cu proteină va prezenta o curbă de absorbţie a cărui maxim va fi turtit datorită valorii ridicate a absorbţiei sale la 280 mμ. Pentru o proteină pură, cum este

enolaza, şi pentru un acid nucleic pur, Warburg şi Christian (1941) au stabilit următoarele raporturi :

$$\frac{\beta\,280}{\beta\,260} = \frac{2{,}06}{1{,}18} = 1{,}75 \text{ în cazul enolazei şi}$$

$$\frac{\beta\,280}{\beta\,260} = \frac{24{,}8}{50{,}8} = 0{,}49 \text{ în cazul acidului nucleic din drojdie (Merck)}$$

unde β reprezintă coeficientul de extincţie al enolazei sau al acidului nucleic definit prin

$$\beta = \frac{1}{C} - \frac{1}{d} \ln \frac{L_o}{L}$$

în care C este concentraţia în miligrame pe mililitru şi d lungimea drumului luminei în centimetri iar Lo şi L intensitatea luminii incidente şi respectiv a celei transmise.

În general, pentru preparate de acid nucleic pure raportul $\frac{\beta\,280}{\beta\,260}$ se găseşte între 0,46 şi 0,49.

Warburg şi Christian (1941) au stabilit ecuaţia după care se poate determina concentraţia de proteină dintr-un amestec de acid nucleic şi proteină pe baza densităţii optice (D.O.) a amestecului la 280 mμ şi 260 mμ.

Concentraţia de proteină (mg/ml) $= F_x \frac{1}{d} \times$ D.O. la 280 mμ, în care F este factor definit :

$$F = \frac{2{,}303}{\beta\,280} \times \frac{\text{procente de proteină}}{100}$$

iar d are caracteristicile arătate mai sus.

Valorile factorului F s-au stabilit cu ajutorul unor amestecuri de acid nucleic — proteină, în diferite proporţii (tabelul 28).

Reacţii de hidroliză a acidului ribonucleic

Există mai multe posibilităţi de a determina compoziţia şi secvenţa nucleotidelor în ARN. Astfel, se poate realiza o hidroliză specifică asupra ARN extras şi nemodificat ; sau, acesta poate fi modificat într-un anumit mod, de obicei printr-un tratament chimic, pentru a uşura sau împiedica hidroliza într-un anumit punct al secvenţei. De asemenea, mai există

posibilitatea de a încorpora un anumit nucleotid la capătul lanţului ribonucleic cu ajutorul unei enzime specifice şi apoi să i se facă hidroliza.

Descriem mai departe principalele metode de hidroliză întrebuinţate în mod curent pentru determinarea compoziţiei şi secvenţei unui ARN nemodificat.

Tabelul 28

Determinarea spectrofotometrică a proteinei dintr-un amestec cu acid nucleic

$R_{280/260}$	Acid nucleic	Fm
1,75	0,00	1,116
1,63	0,25	1,081
1,52	0,50	1,054
1,40	0,75	1,023
1,36	1,00	0,994
1,30	1,25	0,970
1,25	1,50	0,944
1,16	2,0	0,899
1,09	2,50	0,852
1,03	3,00	0,814
0,979	3,50	0,776
0,939	4,00	0,743
0,874	5,00	0,682
0,846	5,50	0,656
0,822	6,00	0,632
0,804	6,50	0,607
0,784	7,00	0,585
0,767	7,50	0,565
0,753	8,00	0,545
0,730	9,00	0,508
0,705	10,00	0,478
0,671	12,00	0,422
0,644	14,00	0,377
0,615	17,00	0,322
0,595	20,00	0,278

Hidroliza alcalină. După Markham şi Smith (1952) desfacerea legăturilor fosfodiesterice internucleotidice şi legăturile fosfatice ciclice se realizează astfel : se tratează ARN cu NaOH 1 N timp de 18 ore la 23°C. După neutralizare, produşii de hidroliză se identifică cu ajutorul cromatografiei sau electroforezei. În ultimul timp majoritatea cercetătorilor realizează hidroliza alcalină a ARN cu KOH 0,3 N, timp de 18 ore la 37°C. După acest interval produsul se neutralizează cu $HClO_4$, iar precipitatul insolubil de $KClO_4$ se îndepărtează prin centrifugare.

Hidroliza acidă. a) Acidul clorhidric 0,1 N hidrolizează, în timp de 4 ore la 23°C, legăturile *2'*, *3'*-fosfatice ciclice terminale ale ARN, trans-

formîndu-le în grupe terminale fosfomonoesterice *2′* sau *3′*. Legăturile internucleotidice rămîn intacte în aceste condiţii (Brown şi colab., 1952).

b) Hidroliza pînă la bazele libere formează obiectul unei descrieri ce însoţeşte metoda de dozare cromatografică pe hîrtie a bazelor.

c) Hidroliza pînă la baze purinice libere şi nucleotide pirimidinice : se tratează ARN cu HCl 1 N timp de 1 oră la 100°C.

Hidrolize enzimatice : *a) Hidroliza cu fosfomonoesteraza prostatică.* Heppel şi colab. (1957) recomandă ca această hidroliză să se efectueze astfel : 0,5 pînă la 1 μmol de ARN se incubează la 37° timp de 4 ore în prezenţa a 24 μg de enzimă în 0,02 ml, $MgCl_2$ 0,1 M în 0,02 ml, tampon acetat 0,5 M pH 5, 0,02 ml, totul în 0,5 ml. În urma hidrolizei se îndepărtează gruparea fosfomonoesterică terminală a ARN.

b) Hidroliza cu 5′-fosfomonoesteraza. Această enzimă hidrolizează numai gruparea fosforică terminală din poziţia *5′*, fără să desfacă alte legături. Amestecul de reacţie conţine : 0,02 ml enzimă (1,5 μg proteină), 0,06 ml substrat (0,5 la 1,0 μ moli), 0,01 ml de tampon glicină 1 M pH 8,5 şi 0,01 ml de MgCl 0,1 M. Incubarea se face la 37,3°C timp de 4 ore (Heppel şi colab., 1957).

c) Hidroliza cu fosfodiesterază din veninul de şarpe : prin acest tratament oligonucleotidele şi polinucleotidele sînt hidrolizate pînă la nucleozid-*5′*-fosfaţi, cu excepţia acelora care au o grupare fosfomonoesterică terminală în poziţia *3′*.

Enzima acţionează extrem de rapid asupra polinucleotidelor şi oligonucleotidelor cu gruparea fosfomonoesterică în poziţia *5′* terminală eliberînd din lanţ numai nucleozid-*5*-fosfaţi. De asemenea, hidrolizează polinucleotidele cu grupare *2′*, *3′*-fosfatică ciclică terminală. Amestecul de incubaţie constă din : 0,03 ml substrat (0,3 pînă la 1,0 μ mol), 0,01 ml de glicocol 1,0 M pH 9,3, 0,02 ml de $MgCl_2$ 0,1 M şi 0,02 ml (0,1 mg) diesterază de venin. Incubaţia durează 4 ore la 37°C (Heppel şi colab. 1957).

d) Fosfodiesteraza din splină. Acţionează asupra polinucleotidelor, oligonucleotidelor şi dinucleozid-monofosfaţilor. Desface legăturile fosfodiesterice eliberînd nucleozid-*3′*-fosfaţi. Este inactivă faţă de polinucleotide, care conţin o grupare fosfomonoesterică în poziţia *5′* terminală. Amestecul de incubaţie : 0,05 ml fosfodiesterază (11 μg proteină), 0,02 ml de succinat de sodiu 0, 25 M pH 6,6 şi 0,03 ml de substrat (0,3 la 1 μmol). Se ţine 3 ore la 37°C (Heppel şi colab., 1957).

e) Hidroliza acidului ribonucleic cu RN-ază pancreatică. Activitatea RN-azei asupra ARN este maximă la pH 7,7 şi la 65°C (Kunitz, 1940). Enzima este suficient de activă la 25° sau 37°C. Majoritatea autorilor execută această reacţie la 37°C. Concentraţia enzimei şi timpul de hidroliză utilizat depind de concentraţia ARN din soluţie şi de scopul urmărit.

Scanned with OKEN Scanner

De obicei se lucrează cu 0,1—100 μg de RN-ază/ml de ARN. Pentru a pune în evidenţă prezenţa fracţiunii de ARN bicatenar dintr-un amestec de ARN, se întrebuinţează concentraţii scăzute de RN-ază şi anume 0,5 μg/ml timp de 20 min la temperatura camerei (Kelly şi Sinsheimer, 1964), sau 0,1 μg/ml în aceleaşi condiţii (Pons, 1964).

f) Ribonucleaza din splină. Maver şi Greco (1956) au separat din RN-aza din splină o fracţiune cu proprietatea specifică de a hidroliza ribonucleotidele ciclice. Nucleozid-*2'*, *3'*-fosfaţii sînt hidrolizaţi la nucleozid-*2'*-fosfaţi. Aceeaşi fracţiune desface legătura $C_{3'}$ — $C_{5'}$ internucleotidică pentru a elibera exclusiv nucleozid-*5'*-fosfaţi.

Amestecul de incubaţie, care conţine 0,02 ml enzimă (0,1 mg proteină), 0,02 ml de succinat de sodiu 0,25 M pH 6,5 şi 0,06 ml substrat (0,3 la 1μ mol), se ţine la 37° timp de 4 ore.

Separarea şi dozarea bazelor şi nucleotidelor acidului ribonucleic

DETERMINAREA BAZELOR AZOTATE CU AJUTORUL CROMATOGRAFIEI PE HÎRTIE

În marea majoritate a cazurilor, compoziţia în baze azotate a ARN se determină sub formă de nucleotide şi nu ca baze libere. Ribonucleotidele pirimidinice sînt extrem de rezistente la acţiunea hidrolitică a acizilor. Condiţiile drastice în care ele eliberează bazele pirimidinice influenţează randamentul hidrolizei.

Există totuşi unele lucrări (Wyatt, 1951; Marshak şi Vogel, 1951), care au demonstrat că acidul percloric în soluţie de 70—72% la 100°C şi în timp de o oră hidrolizează ARN cu un randament aproape de 100%, pînă la bazele libere. Redăm în continuare metoda de lucru întrebuinţată în acest scop, de diferiţi autori.

1) **Hidroliza acidului ribonucleic.** 1—1,5 mg de ARN se hidrolizează cu 0,2 ml de acid percloric 70% pe baia de apă la 100°C timp de 100 min, apoi se diluează cu aproximativ 4 volume de apă şi se neutralizează cu KOH 2 N.

Percloratul de potasiu insolubil care se formează se îndepărtează prin centrifugare. Supernatantul se evaporă pe baia de apă. Se reia cu 0,025 ml HCl 0,5 N. Pentru analiza cromatografică se iau din această soluţie două probe a cîte 0,01 ml fiecare.

Scanned with OKEN Scanner

2) **Cromatografia pe hîrtie.** a) *Hîrtia.* Pentru obţinerea unei bune separări se întrebuinţează o hîrtie de filtru specială pentru cromatografie, de exemplu hîrtia Whatman No. 1, Schleicher- Schüll 2043 B sau altele. Dimensiunea hîrtiei : lungimea (în sensul de migrare specificat de fabrica furnizoare) este de 50 cm, lăţimea este de obicei între 15 şi 30 cm, fiind determinată de numărul probelor şi a martorilor care vor fi analizaţi.

b) *Solvenţi.* Solventul cel mai des întrebinţat pentru separarea bazelor azotate ale acizilor nucleici este constituit dintr-un amestec de izopropanol cu acid clorhidric (Wyatt, 1951) ; el are proprietatea de a separa cele patru baze azotate şi a da spoturile cele mai nete.

Solventul se prepară amestecînd 130 ml de alcool izopropilic absolut fără peroxizi (fracţiunea care distilă între 82° şi 83°C) cu 334 ml HCl concentrat (12 N) şi 36,4 ml de apă. Solventul astfel preparat se introduce imediat în cuva aparatului (tancului) de cromatografiere. În tabelul 29 sînt grupate *Rf*-urile şi solvenţii cei mai frecvent întrebuinţati pentru separarea bazelor azotate (naturale şi sintetice), precum şi pentru ribonucleozide.

3) **Metoda de lucru.** Pe linia de start, situată la 8 cm de extremitatea hîrtiei de filtru în sensul migrării, indicată de fabrică, se aşează pe rînd proba de analizat ,o cantitate egală în volum de HCl 0,1 N, care va servi ca martor alb şi acelaşi volum dintr-un amestec ce cuprinde cele patru baze în concentraţie cunoscută (între 10 şi 40 de μg) fiecare dizolvate în HCl 0,1 N. Proba de analizat se pune la mijlocul liniei de start, iar amestecul de baze în stînga şi în dreapta ei. Se introduce apoi hîrtia de filtru în tancul de cromatografiat pentru irigare pînă cînd frontul solventului ajunge aproape de capătul de jos al hîrtiei. Timpul de irigare depinde de o serie de factori ca : temperatura camerei, felul tancului de cromatografiat etc. ; în cele mai multe cazuri 30 de ore de migrare a solventului sînt suficiente pentru o bună separare.

4) **Detectarea spoturilor.** Hîrtia irigată se usucă la temperatura camerei şi apoi se examinează în lumină ultravioletă la lungimea de undă de aproximativ 260 mμ. Bazele azotate prezintă o absorbţie puternică la această lungime de undă şi din această cauză ele se observă cu ochiul liber sub formă de pete negre pe fondul deschis al hîrtiei. Ele pot fi puse în evidenţă şi prin contactul direct al cromatogramei aşezată peste o hîrtie fotografică şi expusă apoi scurt timp la lumina ultravioletă la 260 mμ. Primul sistem de punere în evidenţă a spoturilor este mai expeditiv şi în majoritatea cazurilor suficient de sensibil.

Pentru punerea în evidenţă a bazelor purinice şi pirimidinice unii autori utilizează anumite metode chimice bazate pe reacţii caracteristice de culoare. Astfel, Vischer şi Chargaff (1948) folosesc în acest scop complexarea cu mercur, iar Michl (1953) colorarea cu eozină sau albastru de

Scanned with OKEN Scanner

bromfenol. Popa (1961) stabileşte o metodă de dozare a derivatelor purinice ale acizilor nucleici pe baza reacţiei lor de culoare cu albastru de bromfenol.

5) **Eluţia.** Spoturile puse în evidenţă de lumina ultravioletă se delimitează cu creionul, iar apoi fiecare spot se decupează cu foarfeca şi se taie în bucăţele. Fragmentele de hîrtie de filtru ale fiecărui spot se introduc în eprubete separate, în care se adaugă 5 ml de HCl 0,1 N şi se agită uşor conţinutul timp de două ore la temperatura camerei. După acest timp, hîrtia de filtru se îndepărtează din soluţie prin centrifugare. Soluţiile clare obţinute sînt apoi analizate spectrofotometric pentru a se determina concentraţia şi puritatea lor.

Tabelul 29

Rf-urile bazelor azotate şi ale nucleozidelor ARN (după Hartmann, 1961)

Compusul	Sistemul de solvenţi				
	*1**	*2*	*3*	*4*	*5*
Adenină	0,28	0,34	0,29	0,24	0,34
Adenozină	0,16	0,31	0,15	0,27	0,50
Guanină	0,07	0,19	0,06	0,09	0,42
Guanozină	0,06	0,25	0,02	0,07	0,67
Citozină	0,13	0,36	0,17	0,25	0,70
Citidină	0,04	0,36	0,06	0,19	0,78
Uracil	0,31	0,67	0,20	0,28	0,79
Uridină	0,14	0,63	0,06	0,18	0,89
5′-Aminouracil	0,11	0,22	0,06	0,16	0,75
5′-Nitrouracil	0,22	0,57	0,07	0,31	0,63
5′-Nitrouridină	0,03	0,55	0,02	0,16	0,82
4′-Metil-uracil	0,39	0,74	0,31	0,39	0,77
4′-Metil-5′-nitrouracil	0,47	0,81	0,11	0,34	0,71
5′-Hidroxiuracil	0,16	0,40	0,11	0,03	0,15
5′-Hidroximetil-uracil	0,21	1,66	—	—	—
5′-Nitrocitozină	0,16	0,24	0,06	0,24	0,54
5′-Metil-citozină	—	—	—	—	—
5′-Hidroximetil-citozină	0,08	—	—	—	—

* *1* = Butanol normal : apă (86 :14).
2 = Izopropanol : HCl 2 N (170 : 80).
3 = Butanol normal : apă : NH_3 conc. (86 :13 :1).
4 = Acetonă : butanol normal : apă : NH_3 conc. (250 : 200 : 75 : 15).
5 = apă : NH_3 conc. (pH 10,0).

6) **Determinarea concentraţiei bazelor azotate** (după Bendich, 1955). Concentraţia bazelor purinice şi pirimidinice ca şi a derivatelor lor se poate determina spectrofotometric, fie din determinarea valorii extincţiei absorbţiei maxime, fie printr-o variantă a acestei metode denumită „tehnica extincţiei diferenţiale".

Scanned with OKEN Scanner

a) *Metoda bazată pe absorbția maximă.* Coeficienții de extincție moleculară (ε) la absorbția maximă sînt înregistrați în tabelul 30. Relația dintre ε și extincția (E) sau densitatea optică (D.O.) este :

$$\text{Molaritatea} = \frac{E}{\varepsilon} = \frac{D.O.}{\varepsilon}$$

În vederea calculului, se definește întîi unitatea D.O. Aceasta se stabilește din D.O. (la maxim) a soluției (sau eluatului), iar valoarea obținută se înmulțește cu volumul total în ml al soluției. De exemplu, D.O. (la 249 mμ) a unui eluat de guanină a fost găsită de 0,582. Întrucît, pentru eluție s-a întrebuințat 5,00 ml de HCl 0,1 N, înseamnă că în eluatul total există $0,582 \times 5,00$ adică 2,91 unități D.O. de guanină. Deoarece 0,0901 micromoli de guanină corespund la o unitate de D.O. (tabelul 30), eluatul conține $2,91 \times 0,0901$, adică 0,262 micromoli de guanină.

b) *Tehnica extincției diferențiale.* Întrucît extractele obținute prin eluarea spoturilor din hîrtia de filtru în soluția 0,1 N HCl, prezintă o absorbție slabă și inconstantă în ultraviolet, este preferabil să se calculeze concentrația bazelor din valoarea lui Δ. Aceasta reprezintă diferența dintre valoarea extincției citită la absorbția maximă și valoarea absorbției citită la o altă lungime de undă ca de exemplu la 290 sau 300mμ.

Tabelul 30

Absorbția în ultraviolet a bazelor purinice și pirimidinice în HCl 0,1 N* (după Bendich, 1955)

Baza azotată	Lungimea de undă a maximului de absorbție (mμ)	$\varepsilon \times 10^{-3}$**	Raportul extincțiilor			Micromoli /unități D.O.
			250/260	280/260	290/260	
Adenina	262,5	12,6	0,78	0,37	0,036	0,0794
Guanina	249	11,1	1,37	0,82	0,48	0,0901
Uracilul	260	8,15	0,85	0,176	0,010	0,123
Timina	265	7,95	0,69	0,55	0,115	0,126
Citozina	276	10,0	0,48	1,50	0,77	0,100
5′-Metil-citozina	283	9,79	0,40	2,53	2,26	0,102
5-Hidroximetil-citozina	279,5	9,70	—	—	—	0,103

* Valorile sînt aplicabile și pentru HCl 0,01 N.

** Coeficientul molar de extincție $= \frac{D.O.}{\text{molaritate}} = \frac{E}{\text{molaritate}}$, unde D.O. este densitatea optică, iar E este extincția.

Pentru soluţiile standard care conţin 10 μg de bază într-un ml de soluţie de HCl 0,1 N, s-au determinat pentru Δ următoarele valori:

Adenină . . . . . $E_{262} = 0{,}930$; $E_{290} = 0{,}031$ $\Delta = 0{,}900$
Guanină . . . . . $E_{249} = 0{,}737$; $E_{290} = 0{,}262$ $\Delta = 0{,}475$
Uracil . . . . . $E_{259} = 0{,}738$; $E_{280} = 0{,}148$ $\Delta = 0{,}590$
Timină . . . . . $E_{265} = 0{,}632$; $E_{290} = 0{,}083$ $\Delta = 0{,}549$
Citozină . . . . . $E_{276} = 0{,}910$; $E_{300} = 0{,}047$ $\Delta = 0{,}863$
5-Metil-citozină . . . . . $E_{283} = 0{,}603$; $E_{310} = 0{,}036$ $\Delta = 0{,}567$

De exemplu, pentru un eluat de adenină, $E_{262,5}$ s-a găsit a fi 0,311 şi E_{240} 0,017. Diferenţa Δ_x este 0,311 — 0,017 = 0,249. Prin urmare, într-un ml există $10\Delta_x/\Delta = 2{,}94/0{,}900 = 3{,}27$ μg de adenină, iar eluatul total (500 ml) conţine 16,35 μg de adenină.

SEPARAREA MONONUCLEOTIDELOR PRIN CROMATOGRAFIE PE HÎRTIE

În solvenţii nepolari, mobilitatea mononucleotidelor este în general scăzută. Ea poate fi însă mărită prin adausul în sistem a unei componente polare. Cu toate acestea exceptînd solventul format din sulfat de amoniu, izopropanol şi acetat de sodiu şi în parte solventul recomandat de Boulanger şi Montreuil (1951) (vezi tabelul 31), care conduce la o separare satisfăcătoare a mononucleotidelor, ceilalţi solvenţi încercaţi au dat rezultate nesatisfăcătoare.

Tabelul 31

Rf-urile mononucleotidelor ARN*

	3′-AMP	2′-AMP	5′-AMP	3′-GAMP	2′-GMP	5′-GMP	3′-CMP	2′-GMP	5′-CMP	UMP	5′-UMP
Solvent 1**	1,0	0,17		2,76	3,62		4,8	5,2		4,8	
Solvent 2***			0,85			0,65			0,67		0,8

*Fiindcă valorile absolute ale Rf sînt supuse unor variaţii cauzate de o serie de factori (temperatura, constituenţi volatili ai sistemului de solvenţi etc.), în tablou sînt prezentate valorile relative ale Rf-urilor în raport cu valoarea 3′-AMP-ului care s-a luat egală cu unu (Heppel şi colab., 1957).
**Sulfat de amoniu saturat — izopropanol — acetat de sodiu 1 N (80 :2 :18, v/v/v) (Markham şi Smith, 1951).
***Izopropanol-apă (70 :30, v/v) în atmosferă de NH_3 (Markham şi Smith, 1952).

Din această cauză separarea mononucleotidelor cu ajutorul cromatografiei pe hîrtie are aplicaţii limitate. Atît metoda electroforezei pe hîrtie cît mai ales cromatografia pe coloană sînt cele mai indicate pentru separarea mononucleotidelor.

În afară de aceşti solvenţi, rezultate bune s-au mai obţinut cu fenol 90%, butanol terţiar, acid formic şi apă (84 : 6 : 10 : 100, în volume).

Scanned with OKEN Scanner

Se întrebuinţează faza apoasă. *Rf* obţinute au fost: 0,70 pentru *2'* şi *3'*-AMP; 0,46 pentru *2'*, *3'*-GMP; 0,35 pentru UMP şi 0,56 pentru CMP (Boulanger şi Montreuil, 1951).

SEPARAREA ELECTROFORETICĂ A MONONUCLEOTIDELOR

1) *Principiu.* În soluţie, o moleculă care este supusă unui gradient electric migrează cu o viteză constantă egală cu raportul EQ/K (E este gradientul de tensiune; Q sarcina netă pe moleculă dată de suma algebrică dintre numărul de grupe ionizabile şi procentul lor de disociere, iar K o constantă care depinde atît de mărimea şi forma moleculei cît şi de efectele de reţinere datorite celorlalţi ioni din soluţie) (Smith, 1955).

2) *Materiale*: a) Aparat de electroforeză construit pentru o tensiune de lucru de 1 000 volţi, care să furnizeze un gradient de 20 V/cm.

b) Hîrtie de filtru Whatman Nr. 3-MM de 56 × 8 cm (Smith, 1955) sau 56 × 14 cm (Ortiz şi Ochoa, 1959) (fig. 137).

c) Soluţie tampon formiat de amoniu 0,05 M pH 3,5. Se poate întrebuinţa tampon fosfat sau acetat de aceeaşi molaritate.

3) *Metoda de lucru.* Se umectează hîrtia de filtru Wathman nr. 3 în soluţia tampon, îndepărtînd apoi excesul. La aproximativ 12 cm de capăt se depune dealungul unei linii perpendiculare pe lungimea hîrtiei 0,1—0,2 ml din soluţia de nucleotide care trebuie analizată. Banda de hîrtie astfel pregătită se introduce pentru migrare în aparatul de electroforeză. Markham şi Smith (1952) recomandă în acest scop un aparat

Tabelul 32

Mobilitatea relativă a mononucleotidelor acizilor ribonucleici la pH 3,5 şi 20 V/cm (după Markham şi Smith, 1952)

Mononucleotidul	Mobilitatea relativă	Mobilitatea observată (cm)
Acidul uridilic	1,00	16
Acidul guanilic	0,95	14
Acidul adenilic	0,46	8
Acidul citidilic	0,16	6,5

special de electroforeză. Hîrtia de filtru fiind plasată cu cele două capete ale sale în vasele electrozilor, iar restul într-un vas intermediar plin cu tetraclorură de carbon situat între cei doi electrozi. Efectuarea electroforezei pe hîrtie în mediu de tetraclorură de carbon previne evaporarea tamponului de pe hîrtie şi supraîncălzirea datorită diferenţei de potenţial ridicată. După două ore de migrare la un gradient de tensiune de 20 V/cm, componentele sînt suficient de separate. Hîrtia se usucă iar mononucleo-

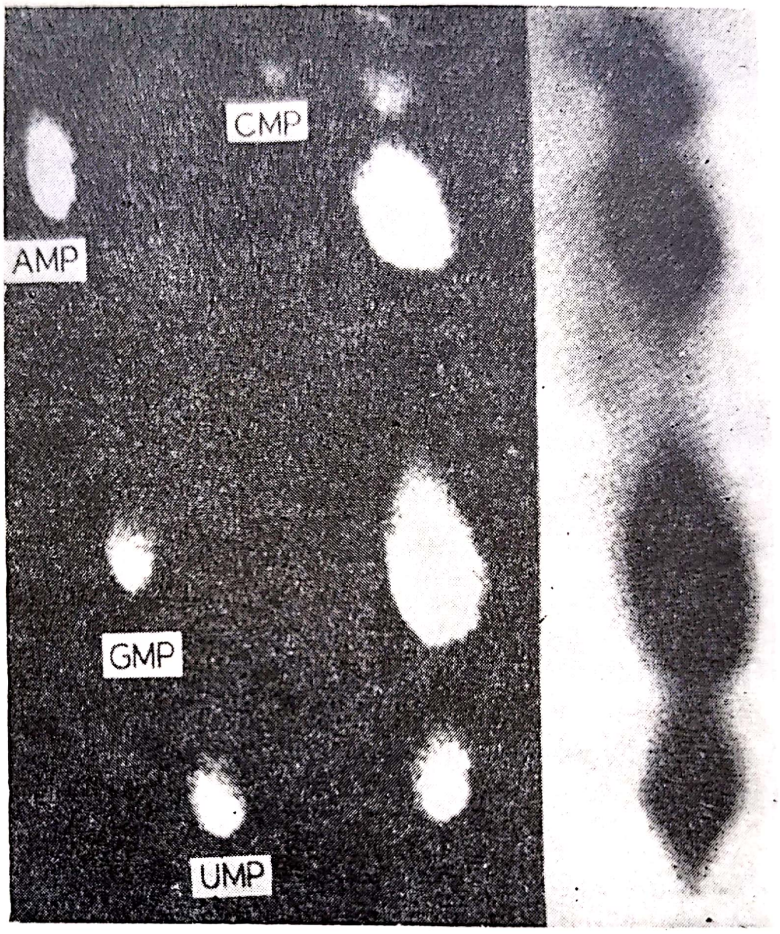


Fig. 137. — Separarea nucleotidelor prin electroforeză pe hîrtie Whatman nr. 3 MM (după Ortiz şi Ochoa, 1959).

Scanned with OKEN Scanner

tidele se localizează în lumină ultravioletă fie prin fotografiere, fie prin examinare directă la 260 mμ.

În condiţiile mai sus arătate migrarea relativă (faţă de acidul uridilic) a mononucleotidelor acizilor ribonucleici este prezentată în tabelul 32.

SEPARAREA MONONUCLEOTIDELOR PE COLOANĂ CROMATOGRAFICĂ

Pentru separarea pe coloană a mononucleotidelor se întrebuinţează de obicei schimbătorii anionici ca: DEAE-celuloza, Dowex-1 sau 2, Amberlit 1 R-400 sau 1R-410. Recent, Katz şi Comb (1963) recomandă fracţionarea mononucleotidelor ARN pe coloane mici de cationit (Dowex-50-H^+).

În cazul răşinilor schimbătoare de ioni de tip Dowex o mare importanţă o are procentul de divinil-benzen folosit pentru a lega moleculele liniare de polivinil-benzen într-o structură tridimensională, denumit pe scurt procentul de legături „în cruce" (Cross-link) sau „înreţelarea" răşinei.

În mod obişnuit se întrebuinţează produse cu 8—10% legături „în cruce". Reţeaua (*cross-linking*) se exprimă fie în procente, fie prin semnul X urmat de o cifră care reprezintă procentul de divinil-benzen. De exemplu Dowex-1-Cl^- X 8 este Dowex-1-Cl^- cu 8% divinil-benzen ca agent de înreţelare.

În ceea ce priveşte dimensiunile particolelor sferice ale răşinii, cele mai bune rezultate s-au obţinut cu răşini de 200—400 mesh.

1) **Pregătirea răşinii (de tip polistirenic).** Înainte de întrebuinţare, răşina se spală cu apă, acetonă-apă, acetonă, eter de petrol, acetonă, acetonă-apă şi apă pentru a îndepărta substanţele organice care o impurifică.

În majoritatea cazurilor răşina se livrează de fabrica producătoare sub formă de clorură. Ea poate fi convertită într-o altă formă de sare (formiat, acetat etc.). Aceasta se realizează în cele mai bune condiţii cu săruri de sodiu ale acizilor respectivi (formiat, acetat). Întrebuinţarea acizilor în acest scop nu este potrivită. Datorită ionizării lor slabe ei nu pot înlocui eficient anionul Cl^-.

Răşinile sub formă de clorură se spală cu HCl concentrat, aceasta îndepărtează toate impurităţile acidosolubile existente în răşină, lăsînd-o sub formă de clorură. Urmează apoi spălarea răşinii cu apă pentru a elimina HCl. După spălarea cu apă răşina este pregătită pentru absorbţie.

Transformarea răşinii Dowex-1-Cl^- în Dowex-formiat. Răşina Dowex-1-Cl^- (200—400 mesh, X8 sau X10) se suspendă în apă, iar particulele foarte fine se decantează. Urmează apoi spălarea ei cu formiat de sodiu

3 M pînă cînd lichidul eluent nu mai conţine Cl^-. În continuare, se spală cu apă. Răşina astfel spălată se introduce în coloana cromatografică în vîrful căreia se aşează discuri de hîrtie de filtru, care împiedică antrenarea granulelor de răşină. Pentru a îndepărta toate impurităţile, se spală răşina cu o cantitate de acid formic (soluţie 88%) ce reprezintă un volum de 2—3 ori mai mare decît cel al coloanei. Operaţia de pregătire se încheie printr-o spălare minuţioasă cu apă pînă cînd valoarea pH-ului eluentului ajunge la 5 sau 6.

2) **Activarea DEAE-celulozei** (după Staehelin, 1961). Pentru a fi utilizabilă, DEAE-celuloza se tratează cu NaOH 0,5 N, apoi se spală cu apă distilată pe o pîlnie Büchner pînă la neutralitate. Celuloza este apoi spălată de trei ori cu alcool etilic 95% şi de mai multe ori cu apă. După o nouă tratare cu NaOH 0,5 N şi apă, DEAE-celuloza este spălată cu tampon Tris şi 0,01 N formiat pH 8,6. Pentru ajustarea pH-ului s-a întrebuinţat acid formic 1 N. În continuare, absorbantul se spală de 3 ori cu o soluţie de bicarbonat de amoniu 0,01 N, care a fost ajustată la pH 8,6 cu amoniac, tampon care serveşte şi la obţinerea suspensiei de celuloză.

3) **Absorbţia.** De obicei probele sînt diluate înainte de a fi absorbite pe coloană; ele trebuie să aibă un pH 6—7. Uneori se recomandă ca absorbţia să se facă la alte pH-uri; aceasta depinde de răşina folosită pentru separare cît şi de pH-ul tamponului utilizat pentru eluţie (de exemplu, absorbţia nucleotidelor pe DEAE-celuloză se face la pH 8,6).

Absorbţia are ca scop reţinerea substanţelor la vîrful coloanei. Ea depinde de: *a*) echilibrul dintre soluţie şi schimbător, acesta fiind condiţionat în special de forţa ionică a mediului; *b*) de viteza de schimb, care este determinată de viteza de curgere şi de mărimea particulelor de răşină (în *mesh*), ca şi de sarcina repartizată pe ionii implicaţi.

4) **Eluţia.** Afinitatea şi proprietăţile ionice ale diferitelor mononucleotide variază foarte mult; din această cauză, ele nu pot fi separate cu acelaşi eluent. Eluţia lor de pe coloană se face prin creşterea fie a aciditătii, fie a forţei ionice a eluentului. Există cazuri în care aceste variabile sînt crescute simultan, continuu sau discontinuu, printr-un procedeu hidrodinamic.

Acizii citidilici şi adenilici se separă rapid de pe coloana de Dowex-1-Cl^- cu HCl 0,002 N. Prin creşterea aciditătii cu 0,005 N HCl, se separă apoi şi acizii uridilici şi guanilici.

5) **Trecerea eluentului prin coloană sub presiune.** Pentru a asigura o curgere uniformă şi totodată rapidă a eluentului prin coloană, noi am realizat cu o pară de cauciuc (*PC*)o presiune de aer variabilă între 0 şi 12 cm Hg aplicată în pîlnia de decantare *P* (fig. 138). Între pară

şi pîlnia de decantare se intercalează un rezervor de aer (R), constituit dintr-un flacon cu capacitate mare. Controlul presiunii se face cu un manometru (M) gradat în cm de Hg. Cu acest sistem, am obţinut, în funcţie

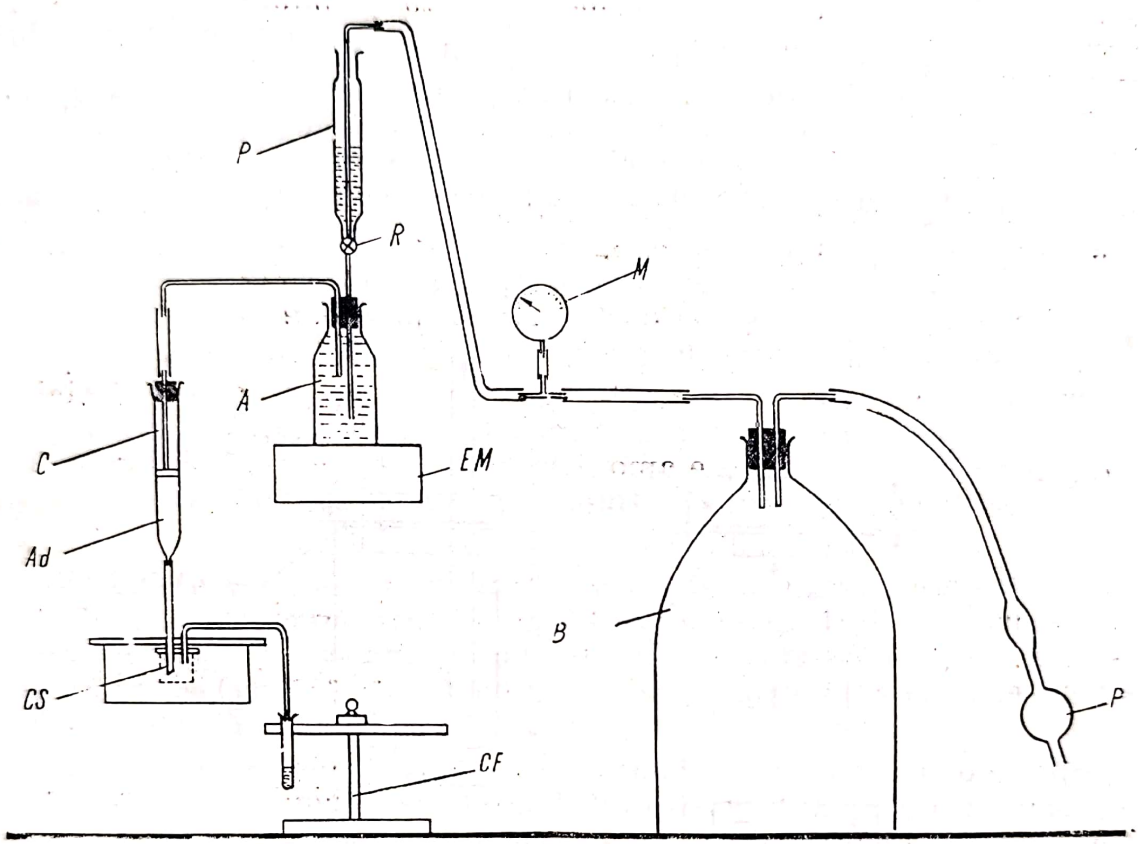


Fig. 138. — Reprezentarea schematică a sistemului de eluţie şi citire continuă a valorii extincţiei eluatului obţinut de pe coloana cromatografică (după Portocală şi Popa, 1964).

de presiune, o viteză de curgere constantă, al cărui debit poate fi reglat între 0,3 şi 3 ml de eluat pe minut, în cazul unei coloane de 5 × 2 cm.

Dat fiind faptul că volumul de eluat ce trece prin coloană nu depăşeşte 100 ml, un rezervor de aer cu o capacitate de 5 000 de ml este practic suficient pentru a menţine prin coloană o curgere uniformă sub presiune constantă în tot timpul experienţei.

Înainte de a adsorbi substanţa pe coloană, aceasta se spală cu tamponul care va fi întrebuinţat pentru eluţie. Controlul spălării se face examinînd la spectrofotometru, extincţia tamponului trecut prin coloană.

6) **Adaptarea spectrofotometrului pentru citire continuă.** După tehnicile curent utilizate, eluatul trecut prin coloană se colectează în diferite eprubete, la un anumit volum ele se schimbă periodic, manual

sau automat cu ajutorul unui colector de fracţiuni. Abia după ce au fost colectate se examinează conţinutul fiecărei eprubete în spectrofotometru.

Considerînd că eluţia se face numai cu 100 ml de eluant, iar în fiecare eprubetă s-a colectat 2 ml, în acest caz vom avea de examinat 50 de eprubete. Citirea efectivă la spectrofotometru a 50 de probe necesită un timp considerabil. În afară de aceasta, dată fiind marea instabilitate a structurii moleculare a unor substanţe pusă în evidenţă chiar prin studiile spectrofotometrice, păstrarea acestor molecule în contact cu soluţiile cu forţă ionică diferită le influenţează structura şi implicit valoarea extincţiei. Din aceste cauze, citirea discontinuă are desavantaje care nu trebuie neglijate.

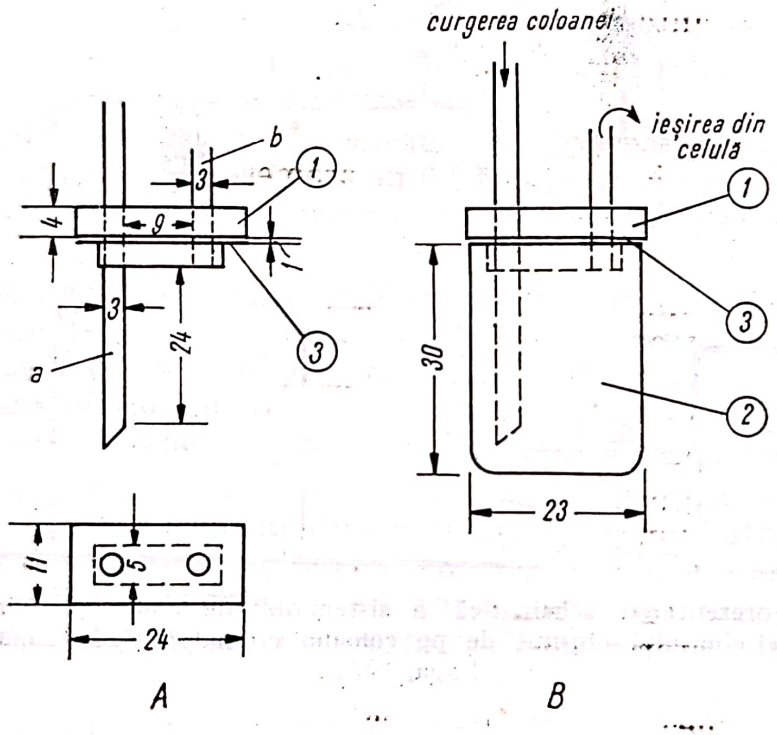


Fig. 139. — Detaliile cuvei spectrofotometrului, montată pentru eluţia şi citirea continuă (după Portocală şi Popa, 1964).

Am căutat să eliminăm aceste neajunsuri prin adaptarea spectrofotometrului Zeiss-VSU$_1$ pentru citirea continuă a eluatului după ieşirea lui din coloana cromatografică.

În acest scop, cuva de cuarţ de 0,5 m grosime a fost prevăzută cu un capac *1* reprezentat în figura 139 confecţionat din plexiglas prin care trec două tuburi *a* şi *b*. Acest capac este aşezat pe cuva spectroscopului (fig. 139 *B*) pe care o închide ermetic datorită garniturii de cauciuc *3*. Întreg dispozitivul este fixat în suportul special al spectrofotometrului, suport al cărei deschidere este ecranată. Fanta tăiată în ecran este astfel calculată şi centrată încît se aşază exact în drumul fasciculului luminos

emis de monocromator. În acest mod, în drumul fasciculului dintre monocromator şi celula fotoelectrică este aşezată celula permiţînd o citire continuă a substanţei eluate din coloană.

Prin tubul *a* , care este legat direct la coloană, pătrunde eluatul pînă în fundul cuvei spectrofotometrice. Pe măsură ce eluatul se scurge din coloană, prin al doilea tub iese o cantitate echivalentă de lichid, care se colectează fie într-un colector de fracţiuni, fie în eprubete gradate.

În acest fel, eluatul trece continuu prin cuva spectrofotometrului şi poate fi examinat din 0,2 în 0,2 ml (sau mai puţin). Eluţia în gradient continuu are avantajul de a uşura trecerea progresivă a eluatului prin faţa fantei spectrofotometrului de jos în sus. Pe măsură ce, în cuvă intră gradienţi din ce în ce mai crescuţi, aceştia obligă eliminarea gradienţilor mai mici pătrunşi anterior în cuvă. Astfel, curgerea continuă prin celulă a eluatului este asigurată, fără turbioane datorită diferenţelor de concentraţie.

Pentru aplicarea acestui sistem, mai este necesară înlocuirea capacului care închide cutia cuvelor spectrofotometrului, cu un alt capac, care este perforat în dreptul celor două tuburi adaptate la capacul cuvei.

7) **Citirea continuă.** Cuva modificată este aşezată cu ajutorul suportului ei în spectrofotometru. La capătul superior al tubului *a*, tub care trebuie să aibă dimensiuni cît mai reduse, se introduce vîrful coloanei cromatografice. Robinetul *R* fiind închis, se realizează cu para de cauciuc presiunea dorită.

Prisma monocromatorului ca şi condensorul lămpii de hidrogen sînt reglate pentru lungimea de undă la care substanţa are maximul de absorbţie. Cuva „CS" fiind plină cu lichidul care a spălat coloana înainte de introducerea probei, serveşte pentru reglarea sistemului de compensare al spectrofotometrului şi obţinerea punctului „zero". Această reglare fiind efectuată, se introduce cu o pipetă gradată un volum determinat din soluţia care urmează să fie fracţionată pe coloană. Cu ajutorul dopului de cauciuc prin care trece tubul cu soluţia de NaCl tamponată, se astupă coloana. Se pune în mişcare agitatorul magnetic din flaconul *A* şi se deschide robinetul *R*. Datorită presiunii existente în vasul *B*, lichidul din pîlnia *P* pătrunde în vasul *A*, realizînd scurgerea în coloană a unui gradient crescător de eluent. În acest moment, şi în funcţie de gradient, în cuva *CS* se pot pune în evidenţă diferitele fracţiuni eluate de pe coloană.

Evoluţia valorilor diferitelor fracţiuni este evidenţiată prin obţinerea unor maxime de extincţie. Aceste maxime pot fi înregistrate prin compresarea dispozitivului spectrofotometric, astfel încît firul electrometrului este în permanenţă redus la punctul zero. Cifrele citite pe tamburul compensatorului, raportate la volumele de eluent trecut prin coloană şi implicit la variaţiile molarităţii, sînt înregistrate grafic. Ele dau curbe caracteristice pentru produsul studiat.

Scanned with OKEN Scanner

8) **Eluţia în gradient continuu.** Eluţia progresivă sau eluţia în gradient continuu am realizat-o prin sistemul reprezentat în figura 138. În pîlnia de decantare (*P*) se introduce substanţa al cărei gradient trebuie crescut (molaritatea acesteia se stabileşte în funcţie de proprietăţile specifice ale produsului supus analizei) dizolvată în tampon adecvat, iar în balonul de amestecare (*A*) se introduce tampon. Prin curgerea continuă a soluţiei concentrate din pîlnie, în balonul de amestecare care este agitat continuu cu un agitator magnetic (*EM*) se realizează creşterea gradată a concentraţiei substanţei *X*. Volumele celor două soluţii se aleg în raport cu scopul urmărit. Pentru o creştere mică a gradientului se va lua un volum mic cu o concentraţie scăzută din soluţia substanţei *X*.

Pe măsură ce soluţia concentrată din pîlnia de decantare pătrunde în balonul de amestecare, din acesta iese prin tubul lateral spre coloană (*C*) o cantitate echivalentă în volum de tampon cu o concentraţie din ce în ce mai mare de substanţă *X*.

9) Exemple : a) *Fracţionarea mononucleotidelor pe coloană de DEAE-celuloză* (după Staehelin 1961). Aproximativ 20 mg de ARN se dizolvă în KOH 1 N şi se incubează 18 ore la 28°C. Soluţia se neutralizează cu $HClO_4$, iar $KClO_4$ insolubil rezultat se îndepărtează prin centrifugare. Supernatantul rămas adus la pH 8,6 se introduce într-o coloană de DEAE-celuloză cu dimensiunile de 50×1 cm. Eluţia se face cu un gradient de bicarbonat de amoniu pH 8,6. În acest scop autorul recomandă utilizarea a 6 camere „Varigard" fiecare conţinînd 400 ml de bicarbonat de amoniu de următoarele concentraţii 0,01 M, 0,025 M, 0,05 M, 0,075 M, 0,1 M şi 0,125 M.

În urma eluţiei fiecare nucleotid purinic se fracţionează în cei doi izomeri (*2'* şi *3'*) corespunzători în timp ce nucleotidele pirimidinice izomere (*2'* şi *3'*) se găsesc împreună, (fig. 140). Întotdeauna primul care se eluează este izomerul-*2'* după care urmează izomerul-*3'* al aceluiaşi nucleotid.

Existenţa nucleotidelor pirimidinice izomere au fost puse în evidenţă prin cromatografia pe hîrtie utilizîndu-se ca solvent sulfat de amoniu-tampon pH 6-izopropanol. Identificarea lor s-a făcut şi prin metoda spectrului diferenţial.

b) *Fracţionarea mononucleotidelor pe coloană de Dowex-1-formiat* (după Miura, 1962). În figura 141 este reprezentată curba fracţionării mononucleotidelor acidului ribonucleic cu ajutorul unei coloane Dowex-1-formiat. Acidul nucleic a fost hidrolizat cu o soluţie de KOH 0,5 N timp de 18 ore la 37°C. Din hidrolizatul răcit şi neutralizat cu $HClO_4$ conc. s-a îndepărtat prin centrifugare materialul insolubil după ce în prealabil a fost spălat cu puţină apă. Supernatantele reunite au fost introduse în coloană prin care s-au separat ribonucleotidele cu ajutorul unui gradient continuu de concentraţie de acid formic. La începutul eluţiei se utilizează 36 ml de acid formic 1 N şi apoi 350 ml de acid formic 4 N. Fracţiunile culese într-un colector de fracţiuni au fost analizate spectrofotometric, iar absorbanţa lor determinată la 260 şi 280 mμ faţă de apă. Concentraţia mononucleotidelor

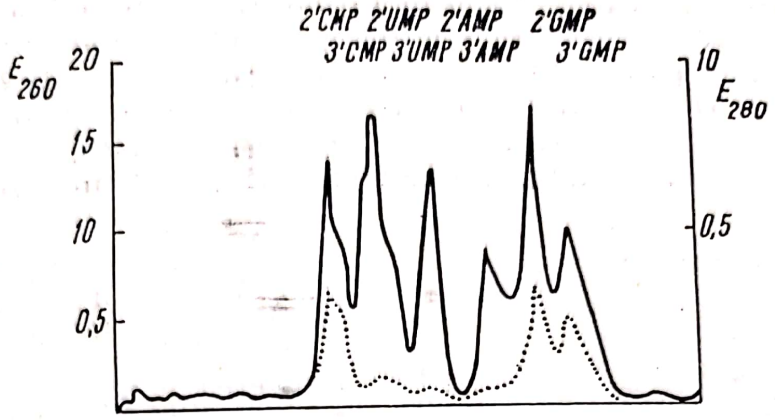


Fig. 140. — Fracţionarea pe coloană de DEAE-celuloză a mononucleotidelor ARN. Extincţia la 260 mμ (———); extincţia la 280 mμ (....) (după Staehelin, 1961).

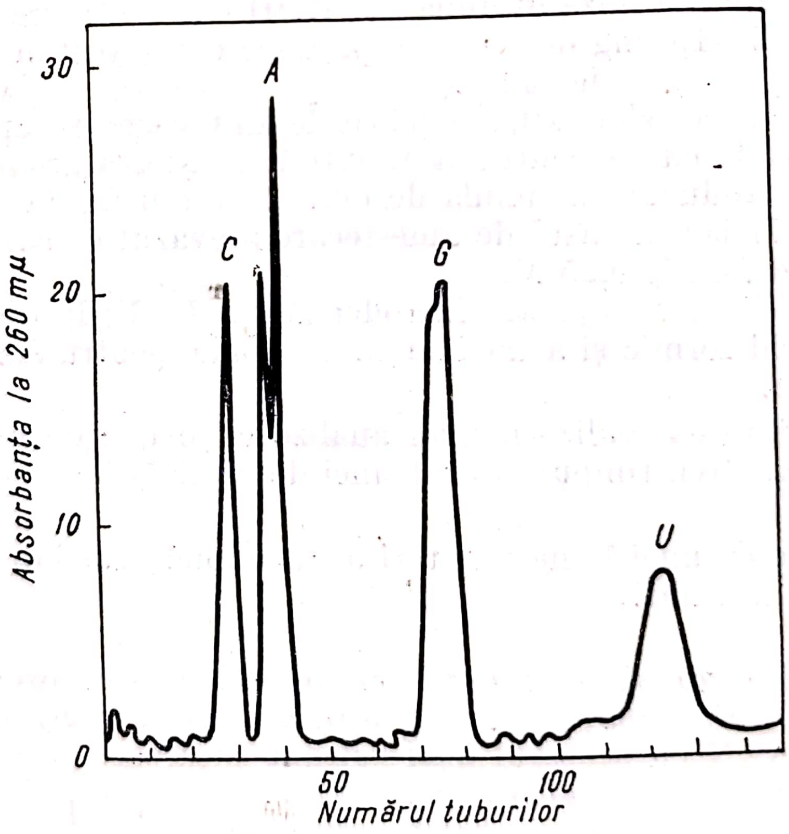


Fig. 141. — Curba de eluţie a unui hidrolizat alcalin de ARN, obţinut cu o coloană de Dowex-1-formiat X2, 200 mesh (0,6 × 27 cm/; C, A, G, şi U reprezintă acizii citidilic, adenilic, guanilic, şi uridilic.

Scanned with OKEN Scanner

a putut fi determinată cu ajutorul următorilor coeficienţi de extincţie; acidul citidilic 13,0 la 280 mμ, acidul pseudouridilic 8,3 la 260 mμ, acidul uridilic 9,9 la 260 mμ, acidul guanilic 13, 0 la 260 mμ şi acidul adenilic 14,2 la 260 mμ. Deviaţia standard a mediei a două sau trei determinări a fost, în aceste cercetări, situată între 0,5 şi 3%. După cum reiese din rezultatele arătate, separarea mononucleotidelor izomere nu a putut fi realizată.

c) *Un profil de eluţie diferit*, în care mononucleotidele izomere ale ARN sînt bine separate, a fost obţinut de Volkin şi Carter (1951) cu ajutorul unei coloane de Dowex-1-Cl. Acizii citidilici şi adenilici se eluează primii cu o soluţie de HCl 0,002 N. Prin creşterea acidităţii soluţiei la 0,003 N se eluează apoi acizii uridilici şi în sfîrşit acizii guanilici cu HCl 0,005 N (figura 142).

d) *Fracţionarea mononucleotidelor pe Dowex-2-X8*. Popa şi colab. (1966) descriu o metodă pentru analiza nucleotidelor ARN bazată pe utilizarea unei coloane cromatografice de tip Dowex-2 X8 transformate în stare de formiat. Eluţia de pe coloană se realizează cu un gradient de concentraţie de acid formic cuprins între 0,25 şi 3 M. Eluţia mononucleotidelor ce rezultă din hidroliza alcalină (cu KOH 0,3 N, 18 ore la 37°C) a unei cantităţi de 0,5—1,5 mg de ARN se produce cantitativ în ordinea : CMP, AMP, GMP şi UMP (fig. 143).

Pentru eluţia celor patru nucleotide sînt necesari aproximativ 100 ml de acid formic cu concentraţia amintită. Creşterea gradientului se realizează uşor introducînd în pîlnia de decantare din figura 137, 100 ml de acid formic 4 M iar în vasul de amestecare prevăzut cu agitare magnetică 100 ml de acid formic 0,25 M.

Principalele avantaje ale metodei sînt : *1*) Utilizarea unui singur gradient de acid formic şi a unei singure coloane pentru fracţionarea mononucleotidelor.

2) Posibilitatea realizării unei analize cu o cantitate mică de acid nucleic şi de reactivi, timpul afectat unei determinări este de aproximativ două ore.

3) Obţinerea unei bune separări a mononucleotidelor, a identificării şi dozării lor cantitative.

e) *Fracţionarea mononucleotidelor pe cationit* (Dowex-50-H^+). Recent Katz şi Comb (1963) au descris o metodă nouă pentru determinarea nucleotidelor ARN cu ajutorul unei coloane încărcate cu cationit. Avantajul metodei constă în faptul că ea poate fi întrebuinţată pentru analiza unor cantităţi mici de hidrolizat (80—800 μg ARN). Totodată durata unei determinări nu depăşeşte o oră.

Coloana de Dowex-50-H^+ recomandată de aceşti autori separă cu aproximativ 40 ml de eluant acidul uridilic de acidul guanilic, în timp ce

Scanned with OKEN Scanner

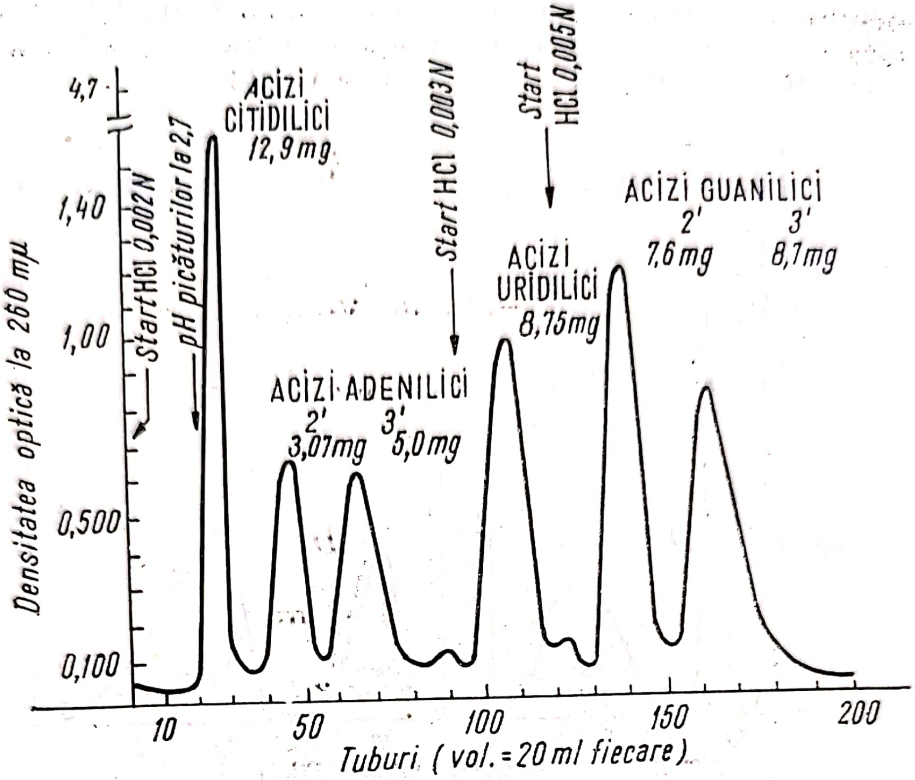


Fig. 142. — Fracţionarea pe coloană de Dowex-1-Cl^- (400 mesh) a hidrolizatului alcalin de ARN din ficatul de şobolan (aprox. 50 mg). Dimensiunea coloanei 6 cm × 0,72 cm^2 (după Volkin şi Carter, 1951).

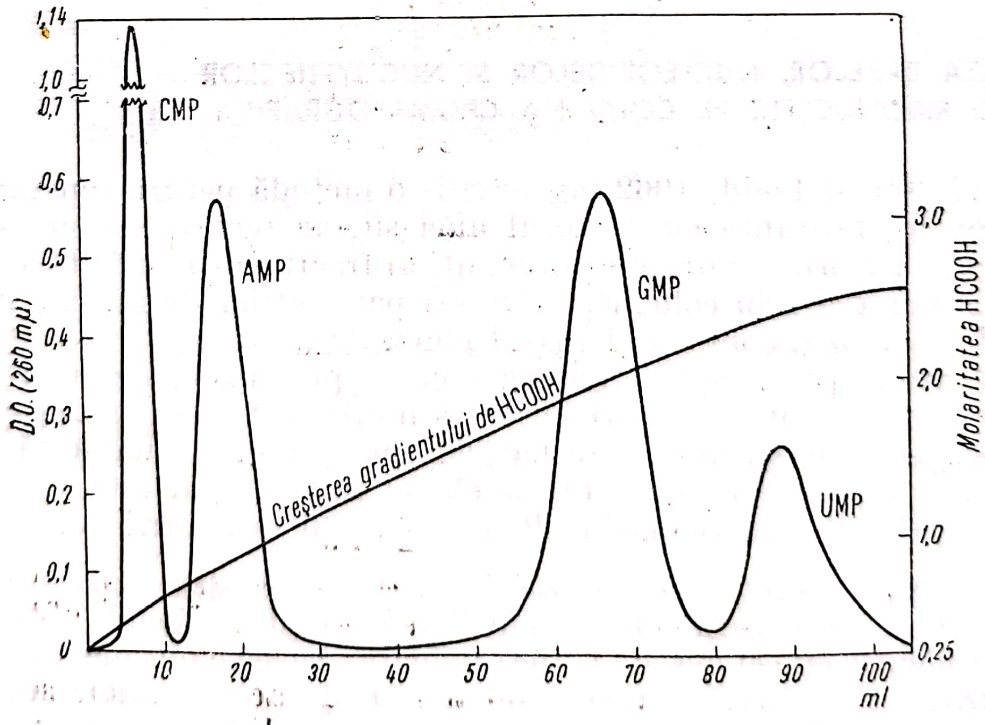


Fig. 143. — Fracţionarea hidrolizatului alcalin de ARN din ficatul de şoarece (aprox. 1 mg) pe coloană de Dowex-2- X8 formiat (după Popa şi colab., 1966).

Scanned with OKEN Scanner

acidul adenilic şi citidilic se eluează împreună. Cele două mononucleotide amestecate se separă ulterior cu ajutorul unei coloane de Dowex-1-formiat. Detaliile fracţionării se pot vedea în figura 144.

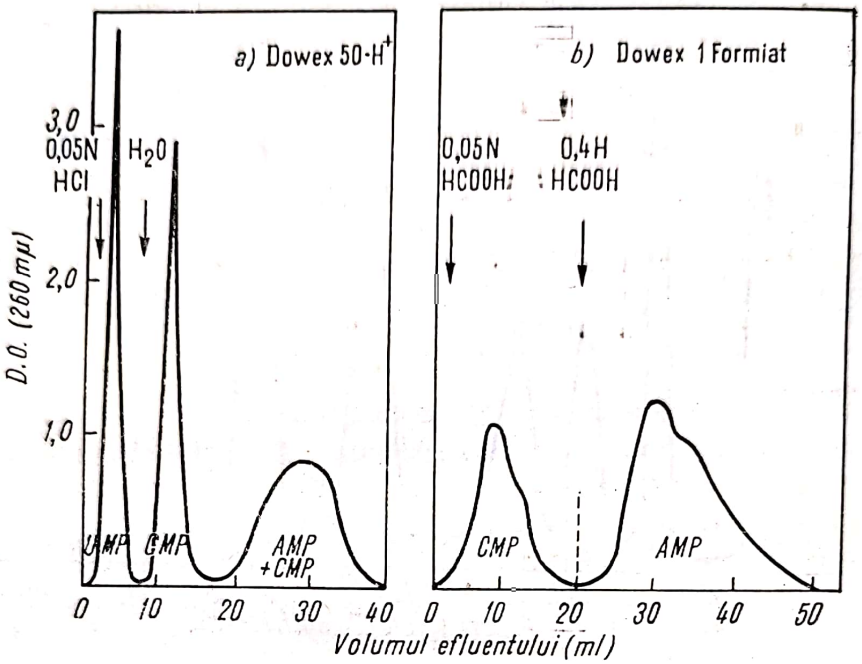


Fig. 144. — *a*) Separarea mononucleotidelor pe Dowex-50-H+ 200—400 mesh; *b*) separarea CMP şi AMP pe coloană de Dowex-1-formiat 200—400 mesh (după Katz şi Combs, 1963).

SEPARAREA BAZELOR, NUCLEOZIDELOR ŞI NUCLEOTIDELOR ACIDULUI RIBONUCLEIC PE COLOANĂ CROMATOGRAFICĂ

Anderson şi Lodd (1962) au descris o metodă pentru separarea celor trei clase de substanţe cu ajutorul unei singure coloane cromatografice. După aceşti autori, factorii determinanţi ai fracţionării sînt : temperatura, viteza de scurgere prin coloană, mărimea particulelor de răşină, lungimea coloanei, compoziţia ionică şi pH-ul eluentului.

Metoda se poate aplica pentru analiza produşilor rezultaţi în urma hidrolizei bazice sau acide, ori în urma iradierii ARN. Analiza completă a unui amestec ce conţine toate bazele, nucleozidele şi nucleotidele ARN durează 24 de ore; volumul total de eluent întrebuinţat este de 1 100 ml. Profilul de eluţie şi particularităţile metodei sînt înregistrate în figura 145.

Calculul concentraţiei nucleotidelor. Concentraţia nucleotidelor se stabileşte cu ajutorul coeficienţilor de extincţie din tabelul 33, printr-un procedeu identic cu cel descris la determinarea bazelor purinice şi pirimidinice. Puritatea produsului se controlează cu ajutorul valorilor rapoartelor prezentate în acelaşi tabel.

Calculul concentrației unui nucleotid dintr-un amestec. Există posibilitatea de a calcula concentrația unui nucleotid (sau a unui alt compus)

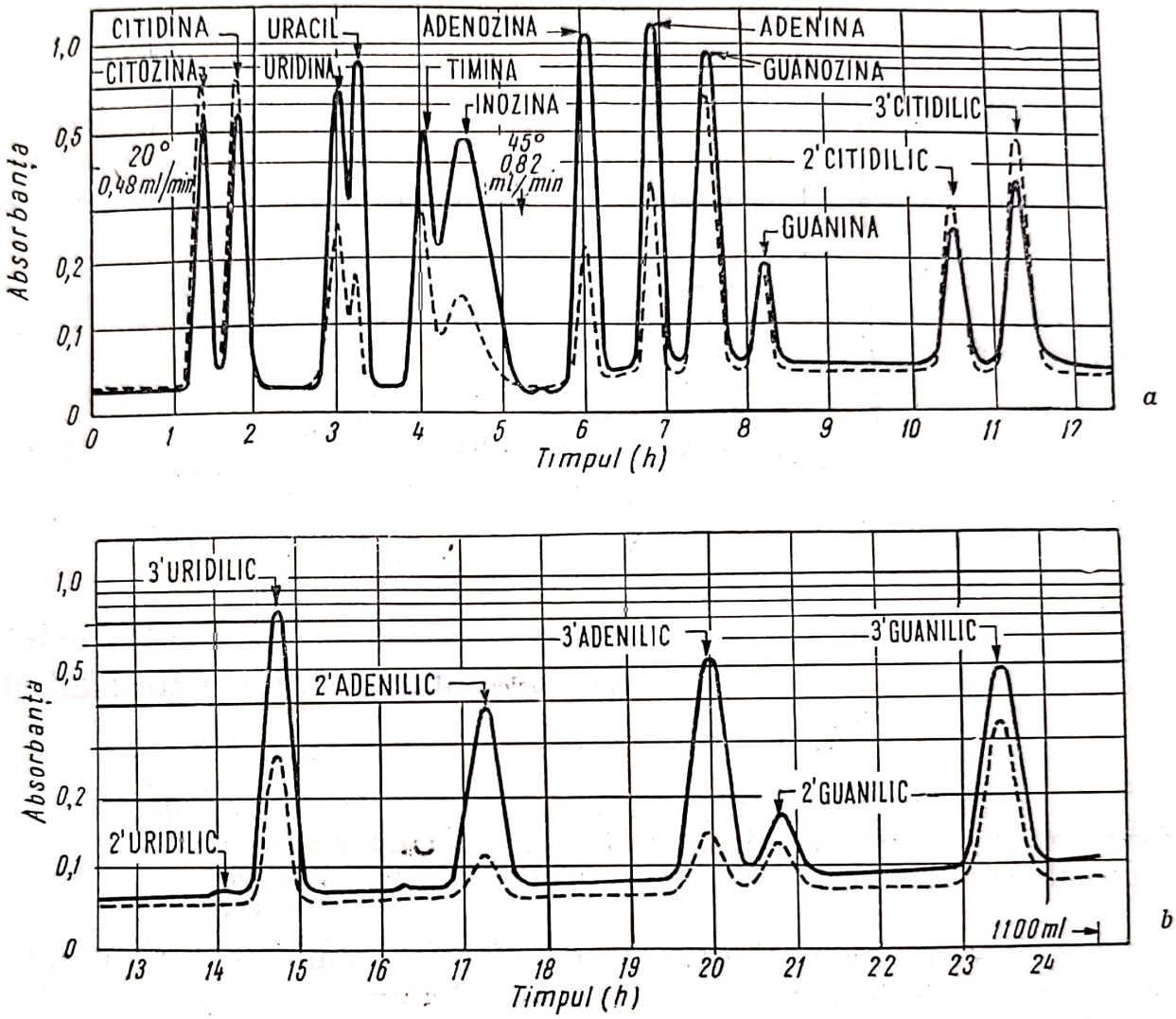


Fig. 145. — Fracționarea bazelor, nucleozidelor și nucleotidelor dintr-un amestec, cu ajutorul unei singure coloane (0,9 × 150 cm) de Dowex-1-X8-acetat, 400 mesh. Eluant = gradient liniar de acetat de sodiu, între 0,6 și 2,0 M cu pH 4,4. Debitul de 0,48 ml/min la 20°C și de 0,82 ml/min la 45°C. Absorbția la 260 mμ (———) și la 280 mμ (— — —) citit la fiecare 5 sec (după Andersen și Ladd, 1962). *a*) fracțiuni separate în primele 24 de ore; b) fracțiuni separate între 13 și 24 de ore.

dintr-un amestec, cu ajutorul unor ecuații cunoscîndu-se valorile absorbanței amestecului la diferite lungimi de undă.

Astfel, absorbția acidului adenilic (x) și a acidului cidilic (y) se poate calcula din următoarele ecuații:

$$x = \frac{2{,}32\ (A_{257}) - A_{279}}{2{,}08}\ ;\ y = A_{279} - 0{,}238\ x$$

în care x este absorbanţa la 257 mμ numai a acidului adenilic, în timp ce y este absorbanţa la 297 mμ numai a acidului citidilic, iar A este absorbanţa (densitatea optică).

Tabelul 33

Coeficienţii de extincţie şi raportul absorbanţei ribonucleotidelor (după Katz şi Comb, 1963)

Nucleotidul	Lungimea de undă (mμ)	Coeficientul de extincţie (M^{-1})	Solventul	A 250/A 260	A 280/A 260
UMP	260	9 600	HCl 0,05 N	0,80	0,364
GMP	257	11 800	HCl 0,05 N	0,949	0,655
CMP	279	13 100	HCl 0,05 N		
AMP	257	14 900	HCl 0,05 N		
CMP	279	12 500	HCOOH 0,05 N	0,473	1,92
AMP	257	14 600	HCOOH 0,4 N	0,851	0,220

Fracţionarea acizilor ribonucleici pe coloană de albumină metilată

1) *Principiu.* Între acidul ribonucleic şi albumina metilată (AM) se formează un complex, datorat probabil legăturilor care iau naştere între grupările aminice bazice libere ale AM şi grupările fosforice acide ale acidului nucleic.

Complexul poate fi disociat cu ajutorul unui gradient continuu sau discontinuu de NaCl.

2) *Prepararea albuminei metilate.* Proteinele au un caracter amfoter datorită prezenţei în molecula lor a grupărilor aminice şi carboxilice. Fraenkel-Conrat şi Olcott (1945) au demonstrat că tratarea proteinelor cu alcool metilic în mediu acid metilează numai gruparea lor carboxilică. Ca o consecinţă a acestei reacţii, albumina (metilată) rezultată devine bazică datorită grupărilor aminice care au rămas libere.

Mandell şi Hershey (1960) descriu astfel prepararea AM: 5 g de albumină se suspendă în 500 ml de alcool metilic absolut, peste care se adaugă 4,2 ml de HCl 12 N. În urma acestui tratament, proteina se dizolvă şi eventual poate fi precipitată din nou. Amestecul se ţine la întuneric timp de 3 zile sau mai mult agitîndu-l din cînd în cînd. Precipitatul se colectează în fiole de centrifugă de 250 ml, se spală cu ajutorul centrifugării, de două ori cu alcool metilic şi de două ori cu eter anhidru. Cea mai

Scanned with OKEN Scanner

mare parte a eterului se evaporă în aer, iar apoi în vid în prezenţa KOH. Materialul obţinut se transformă într-o pudră care se păstrează într-un exicator cu KOH. Bazicitatea produsului final scade dacă nu s-au îndepărtat repede urmele de acid. AM este uşor solubilă în apă şi este stabilă în soluţie sau uscată. Prin acest procedeu se pot prepara uşor probe reproductibile. Proteina se foloseşte sub formă de soluţie 1% în apă.

Menţionăm că, dintre toate albuminele încerate de noi pentru metilare, cele mai bune rezultate au fost obţinute cu albumina serică bovină, fracţiunea a V-a.

3) *Adsorbţia AM pe un suport.* De obicei, pentru AM se întrebuinţează ca suport două substanţe : kieselgurul sau celita. Mandell şi Herhey (1960) realizează astfel adsorbţia AM pe kieselgur : se fierb 20 g de kieselgur (pentru a îndepărta aerul) în 100 ml de NaCl 0,1 M în tampon fosfat 0,05 M. După răcirea suspensiei se adaugă sub agitare continuă 5 ml de AM şi 20 ml de soluţie de NaCl 0,14 M.

Autorii citaţi recomandă întrebuinţarea coloanelor cu trei straturi diferite de adsorbant : a) stratul superior al coloanei conţine o cantitate mică de AM pe kieselgur ; b) stratul mijlociu, cel mai important, a cărui preparare a fost descrisă mai sus ; c) stratul inferior al coloanei care constă numai din kieselgur şi are rolul de „barieră-mecanică".

Monier şi colab. (1962) întrebuinţează o variantă mai simplă a acestui procedeu şi anume : 169 g kieselgur se suspendă în 81 ml de NaCl 0,3 M. Se adaugă apoi 4 ml de soluţie de AM 1% dizolvată în apă. Amestecul se agită cîteva minute, după care se toarnă (în porţiuni mici) în coloană cromatografică, la vîrful căreia se găseşte o cantitate mică de pulbere de celuloză aşezată pe un suport de vată de sticlă. Fiecare porţiune de adsorbant se sedimentează sub o presiune de aer de 0,5 kg/cm^2.

Rezultate asemănătoare se obţin şi cu coloanele umplute cu AM adsorbită pe celită (Kubinski şi colab., 1962 ; Popa, 1964 ; Portocală şi colab., 1964). În toate cercetările noastre asupra fracţionării cromatografice pe coloană a acizilor nucleici am întrebuinţat următorul procedeu : 5 ml de soluţie de AM 1% se amestecă cu 15 g de celită spălată succesiv în prealabil cu NaOH 0,5 N, apă, alcool etilic, apă şi tampon fosfat 0,05 M cu pH 6,7. Amestecul se agită cîteva minute cu o cantitate mică din acelaşi tampon, obţinîndu-se o pastă de consistenţă vîscoasă. Aceasta se spală apoi de două ori cu tampon pe o pîlnie Büchner. Amestecul se reia cu puţin tampon şi se introduce în coloana cromatografică prevăzută la vîrf cu un dop din vată de sticlă.

Dimensiunile coloanelor de albumină metilată întrebuinţată variază în funcţie de scopul urmărit. Sueoka şi Cheng (1962) recomandă în acest scop întrebuinţarea pipetelor de sticlă de 5 sau 10 ml pentru coloanele cromatografice, iar Monier şi colab. (1962) întrebuinţează coloanele de sticlă de 30 × 1,2 cm. Noi am lucrat în special cu coloane ale căror dimensiuni erau de 5 × 0,9 cm, de 5 × 1,5 cm şi de 10 × 1,5 cm.

Scanned with OKEN Scanner

Înainte de întrebuinţare, coloana se spală mai întîi cu tampon, iar apoi cu o soluţie de 0,1—0,3 M NaCl în tampon.

4) *Adsorbţia şi eluţia acidului ribonucleic de pe coloană.* ARN se dizolvă într-o soluţie NaCl 0,14 M (sau 0,3 M după Monier şi colab., 1962) şi se introduce în coloana cromatografică. Eluţia se poate face fie cu un gradient discontinuu de NaCl (Sueoka şi Cheng, 1962), fie continuu (Monier şi colab., 1962 ; Ishihama şi colab., 1962 ; Portocală şi Popa, 1964 ; Popa, 1964).

Tamponul în care se creează creşterea concentraţiei de NaCl este fosfatul de sodiu 0,05 M cu pH 6,7 (Mandell şi Herhey, 1960 ; Sueoka şi Cheng, 1962) sau Tris 0,025 M-HCl cu pH 7 (Monier şi colab., 1962). Pentru eluţia în gradient continuu a ARN, ca şi pentru urmărirea fracţionării pe coloană am întrebuinţat în cercetările noastre sistemul descris anterior la fracţionarea mononucleotidelor. De obicei pîlnia de decantare conţine o soluţie de NaCl 2,5 M în tampon fosfat 0,05 M pH 6,7, iar vasul de amestecare o soluţie tampon fosfat de sodiu 0,05 M la pH 6,7. Cîteva din rezultatele obţinute cu aceste coloane sînt reprezentate în figurile 120, 121 şi 122.

Fracţionarea moleculelor de ARN cu sulfat de streptomicină (după Harshow şi colab., 1962)

Metoda este recomandată pentru separarea moleculelor de ARN înalt polimerizate de moleculele de ARN-*S* (coeficient de sedimentare 4 *S*).

ARN extras cu fenol din celulele mamiferelor conţine trei componente principale care sedimentează prin ultracentrifugare la aproximativ 34, 18 şi 4 *S* (Rosenbaum şi Brown, 1962). Aceşti autori au descris o metodă de precipitare cu NaCl 2 M şi etanol pentru separarea moleculelor de ARN înalt polimerizate de 18 şi 34 *S* într-o fracţiune, iar moleculele de 4 *S* în a doua. O separare eficientă în acest caz necesită însă soluţii cu o concentraţie ridicată de ARN. Or, în majoritatea cazurilor se pune problema fracţionării unei cantităţi mici de ARN. Această dificultate este înlăturată de precipitarea selectivă cu sulfat de streptomicină.

Reactivi: a) Sulfat de streptomicină 0,5% în apă distilată
b) NaCl M.
c) Alcool etilic 95%.
d) Tampon de LiCl 0,14 M, Tris-HCl 0,01 M cu pH 7,6.

Scanned with OKEN Scanner

Metoda de lucru. Se adaugă la soluţia de ARN, picătură cu picătură, sulfat de streptomicină, pînă cînd soluţia devine tulbure şi începe să floculeze. De obicei sînt necesare 3—5 mg sulfat de streptomicină pentru 1 mg de ARN. Amestecul se ţine 1—2 ore timp în care turbiditatea apărută la început se transformă într-un precipitat floculent. Acesta se separă de soluţie prin centrifugare 10 min, la 6 000 *g*. Este de reţinut că ADN prezent în soluţia de ARN este precipitat de asemenea sub forma unui complex de streptomicină-ADN.

Precipitatul se resuspendă într-un volum de NaCl M, egal cu cel original al soluţiei de ARN, iar suspensia se agită viguros pentru a disocia complexul. În urma acestui tratament, se precipită o fracţiune de ARN (fracţiunea A), iar ADN prezent rămîne în soluţie. Supernatantului rezultat după precipitarea cu sulfat de streptomicină i se adaugă NaCl solidă pînă ce soluţia ajunge la concentraţia 1 M, cu scopul de a desface orice complex solubil de ARN-streptomicină existent în soluţie. Se adaugă apoi două volume de alcool etilic 95% pentru a precipita ARN, se obţine astfel fracţiunea B.

Pentru precipitarea completă, ambele fracţiuni înainte de a fi separate se lasă în repaus peste noapte. Sedimentele recoltate după 10 min de centrifugare la 6 000 *g* se dizolvă în tampon LiCl 0,14 M, Tris-HCl 0,01 M cu pH 7,6. Fracţiunile A şi B analizate spectrofotometric dau curbe de absorbţie în ultraviolet tipice de acid nucleic, iar valoarea raportului densităţii optice A 280/A 260 este cuprins între 0,45 şi 0,47.

În general, cantitatea de material izolat în fracţiunea A este de opt ori mai mare decît în fracţiunea B. Fracţiunea A conţine tot ARN care se sedimentează de la 18 *S* în sus şi este eterogenă, în timp ce fracţiunea B conţine o singură componentă care sedimentează la 4 *S* şi care corespunde moleculelor de ARN-*S*. Aceasta conţine în mod obişnuit mai puţin de 5% din ARN înalt polimerizat.

Biosinteza acizilor ribonucleici

EXTRACŢIA ŞI PURIFICAREA POLINUCLEOTID-FOSFORILAZEI
(după Grunberg-Manago şi colab., 1956)

Cantitatea de *Azobacter vinelandii* necesară extracţiei a fost obţinută după tehnica descrisă de Hyndman şi colab. (1953), prin cultivarea bacteriei timp de 15 ore. În acest moment, randamentul a fost de aproximativ 6 g de celule uscate pentru un litru de mediu.

Scanned with OKEN Scanner

Etapa I. *Extracţia.* Enzima, care este uşor solubilă, se poate extrage din celule bacteriene proaspete, uscate cu acetonă sau liofilizate. Preparatele din celulele proaspete sau uscate îşi păstrează activitatea pentru o perioadă lungă de timp dacă sînt păstrate la —18°.

Celulele proaspete se mojarează la 0° cu o cantitate dublă (faţă de greutatea celulelor) de alumină (A_{30} : 325 mesh). Corpii microbieni astfel trataţi se extrag cu 4,5 volume de KCl 0,15 M şi se centrifughează 30 min la 3 000—4 500 *g*. Sedimentul format este reextras cu 2 volume de KCl 0,15 M 30 min, iar amestecul se centrifughează ca mai sus. Supernatantele se reunesc şi se centrifughează la 16 000 t/m 30 min la 0°. Lichidul supernatant obţinut se dializează apoi două ore cu agitare, faţă de tampon fosfat 0,01 M cu pH 7,0. În cazul preparatelor din celule uscate, extracţia se face în acelaşi mod cu excepţia că alumina se ia în cantitate egală cu greutatea celulelor iar volumul soluţiei de KCl 0,15 M utilizat în cele două cazuri amintite este de 22,5, respectiv 100.

Extractul conţine între 8 şi 15 mg de proteină pe ml. O cantitate de extract cu 0,3—1,0 mg de proteină se foloseşte pentru încercarea activităţii (încercarea 1). Activitatea specifică a extractului în acest moment variază între 0,3 şi 0,5.

Etapa a 2-a. *Prima fracţionare cu sulfat de amoniu.* Extractul obţinut ca mai sus se diluează la nevoie cu tampon fosfat 0,01 M cu pH 7,0, pentru a avea o concentraţie de 10 mg proteină pe ml. Se adaugă apoi sulfat de amoniu solid pînă la atingerea saturaţiei de 0,35, agitînd în tot acest timp soluţia mecanic. După 5 min de agitare, amestecul se centrifughează în cameră rece la 20 000 *g*. Precipitatul, care conţine dehidrogenaza — β—hidroxibutirică, se poate păstra şi întrebuinţa pentru extragerea şi purificarea acestei enzime. În supernatantul obţinut, se adaugă sulfat de amoniu pînă la gradul de saturare de 0,46. Precipitatul format conţine cea mai mare activitate polinucleotid-fosforilazică. Această fracţiune, care conţine 20 pînă la 25% din proteina extractului, se dizolvă în tampon fosfat de potasiu 0,01 M cu pH 7,4 şi ulterior se dializează timp de 2 ore, agitînd continuu, faţă de acelaşi tampon. Pentru încercarea activităţii enzimatice, se utilizează echivalentul a 0,2 mg de proteină.

Activitatea specifică a acestei fracţiuni este de aproximativ 2,0.

Etapa a 3-a. *Adsorbţia şi eluţia de pe gelul de fosfat de calciu.* Soluţia dializată, rezultată în urma dizolvării precipitatului obţinut la gradul de saturaţie 0,46, se diluează dacă este necesar cu tampon de fosfat de potasiu 0,01 M cu pH 7,4 pentru a avea o concentraţie de 9—10 mg de proteină pe ml. Totul se răceşte apoi la 0°, temperatură la care se efectuează celelalte operaţii.

În 95 ml de soluţie de enzimă se adaugă 0,9 ml de tampon acetat 1,0 M cu pH 5,1 care aduce soluţia la pH-ul de 5,8, iar concentraţia salină la aproximativ 0,02 M. La fiecare 36 ml de soluţie se adaugă 15 ml

Scanned with OKEN Scanner

gel de fosfat de calciu (cu greutatea uscată de 20 mg/ml). După 20 min de agitare la 0°, gelul, care conţine aproximativ 9% din proteina fracţiunii şi 5% din activitate, se depune prin centrifugare. La supernatantul rezultat se adaugă 5 ml gel de fosfat de calciu şi se centrifughează din nou.

Gelul se eluează mai întîi cu 30—40 ml tampon fosfat de potasiu 0,1 M cu pH 6,0 la 0° şi apoi, după centrifugarea la rece, cu 15 ml tampon de fosfat de potasiu 0,01 M cu pH 7,3. Înainte de întrebuinţare tampoanele au fost aduse la 0°, iar eluţia se realizează la temperatura camerei.

Eluatele se amestecă şi se dializează la 0° timp de 2 ore cu agitare, faţă de o soluţie tampon de fosfat de potasiu cu pH 7,4. Pentru încercarea activităţii enzimatice se ia o cantitate din eluat care conţine 0,25 mg de proteină. Activitatea specifică a eluatului, care conţine aproximativ 18% din proteina fracţiunii cu 76% activitate, este între 8 şi 100. Recuperarea enzimei în lichidul supernatant şi eluatele de pe gel este de aproximativ 90%.

Etapa a 4-a. *A doua fracţionare cu sulfat de amoniu.* Eluatul dializat, care conţine aproximativ 2,5 mg proteină/ml se fracţionează la 0° cu sulfat de amoniu saturat ajustat la pH 7,4 cu hidroxid de amoniu. Se obţin astfel trei fracţiuni: fracţiunea 1, între limitele 0 şi 0,45 saturaţie cu sulfat de amoniu; fracţiunea 2, între 0,45 şi 0,55 saturaţie; şi fracţiunea 3, între 0,55 şi 0,60 saturaţie. Precipitatele obţinute în urma saturaţiei cu sulfat de amoniu se colectează prin centrifugare în camera frigorifică (aprox. 5°) se dizolvă într-un volum mic de tampon fosfat de potasiu 0,01 M cu pH 7,4 şi se dializează faţă de acelaşi tampon cîteva ore, agitînd continuu soluţia.

Fracţiunea 1, care conţine aproximativ 27% din proteină şi 15% din activitate, şi fracţiunea 3, conţinînd 10% din proteină şi 11% din activitatea eluatului, se decantează. Fracţiunea 2, care conţine 32% din proteină şi 73% din activitatea eluatului, este cel mai bun preparat de enzimă. Pentru o încercare se ia o porţiune care conţine 0,02—0,03 mg proteină. Activitatea ei specifică este situată între 18 şi 22. Recuperarea activităţii din cele trei fracţiuni se ridică la 99%.

Un sumar al procedeului de purificare plecînd de la celule uscate cu acetonă este prezentat în tabelul 33.

Activitatea specifică a enzimei extrase din celule proaspete în etapa a 4-a a fost de 14,6—21,6, iar randamentul de 24—28%. În general, etapele de precipitare cu sulfat de amoniu sînt reproductibile, dar gradul succesului depinde în special de etapa de purificare pe gel de fosfat de calciu unde calitatea gelului joacă un rol important.

Testarea activităţii enzimei. S-au ales două căi: *a*) determinarea vitezei de încorporare a ortofosfatului radioactiv în nucleozid-difosfaţi (testul „schimbului de fosfat") şi *b*) determinarea vitezei de eliberare a

Scanned with OKEN Scanner

ortofosfatului din nucleozid-difosfaţi. Pentru testări s-a întrebuinţat atît ADP cît şi IDP.

Testul 1. Amestecul de reacţie conţine următorii componenţi (în μ moli) : tampon Tris cu pH 8,1—100 ; $MgCl_2$—5 ; ADP (sau IDP)—2,5, fosfat de potasiu, cu pH 8,1 şi cu 100 000—200 000 i. p. m. (P^{32})—3,6 (sau 2,5) şi enzima. Volumul final este de 1 ml. În cazul în care se foloseşte ADP, raportul molar ADP/ortofosfat este de 0,7, iar dacă se foloseşte IDP, raportul IDP/ortofosfat este de 10. Amestecul de reacţie se incubează 15 min la 30°. Pentru bunul mers al determinării testului activităţii enzimatice este recomandabil ca în prima etapă de purificare a enzimei să se adauge o mică cantitate de EDTA.

În prezenţa unei cantităţi mici de enzimă, reacţia este liniară pentru o perioadă de timp de cel puţin 60 min.

Se defineşte ca unitate enzimatică, cantitatea de produs care catalizează încorporarea a 1,0 μmol de $P^{32}O_4^{3-}$ în 15 min la 30°C în condiţiile testului 1.

Radioactivitatea din fracţiunea fosfatului organic, determinată prin metoda descrisă la testul 2, serveşte pentru a calcula cantitatea de ortofosfat cu ajutorul expresiei următoare care dă μmoli de fosfat încorporat :

$$\frac{\text{i. p. m. încorporat (}\mu\text{ moli fosfaţi} + \mu\text{ moli ADP)}}{\text{i. p. m. fosfat}}$$

Activitatea specifică a enzimei se exprimă în unităţi pe mg de proteină. Proteina se determină fie prin metoda biuretului, folosindu-se ca etalon standard ovalbumina cristalizată şi dializată în prealabil pentru a fi liberă de săruri, fie spectrofotometric prin măsurarea absorbţiei luminii la 280 şi 260 mμ, după aplicarea corecţiei propusă de Warburg şi Christian (1941) pentru conţinutul în acid nucleic. Prima metodă se întrebuinţează pentru a determina conţinutul în proteină al extractului şi al primei fracţiuni obţinută prin precipitarea cu sulfat de amoniu, care conţine cantităţi mari de acid nucleic; iar a doua pentru ultimele etape de purificare.

Determinarea încorporării ortofosfatului. Conţinutul de ortofosfat încorporat este dat de radioactivitatea remanentă din filtratul liber de proteină, după îndepărtarea ortofosfatului. Procedeul se bazează pe conversia ortofosfatului liber în fosfomolibdat de amoniu şi extracţia acestuia din urmă cu izobutanol, după metoda lui Berenblum şi Chain (1938).

Reacţia se opreşte prin adăugarea unui volum de 0,1 ml din soluţia de acid tricloracetic 40% pentru fiecare ml de amestec de reacţie. După centrifugare, se prelevă cantităţi alicote pentru determinarea radioactivităţii ortofosfatului şi a radioactivităţii fixate. Pentru a îndepărta ortofosfatul, se diluează 1 ml de filtrat liber de proteină în 3 ml apă distilată şi se adaugă 0,3 ml de SO_4H_2 10 M, 1,5 ml de molibdat de amoniu şi 5 ml

de izobutanol. Se asigură o bună agitare a soluţiei prin barbotare cu un curent slab de aer, timp de un minut. Se lasă fazele în repaus pentru a se separa, iar stratul superior de izobutanol se îndepărtează prin aspiraţie. Faza apoasă, care trebuie să fie limpede, se spală cu 3 ml de eter, care apoi se îndepărtează. Se prelevă o cantitate alicotă din faza apoasă (de obicei 1 ml), pentru a determina radioactivitatea fosfatului legat organic.

Dacă acest procedeu se aplică la o probă martor care conţine amestecul de reacţie, la care se adaugă enzimă după ce s-a adăugat acidul tricloracetic, radioactivitatea eliminată este de peste 99%. În acest fel, pentru fiecare experienţă se introduce şi un martor. Radioactivitatea probei oarbe se scade din aceea a probei experimentale pentru a o corecta faţă de cantitatea de ortofosfat neîndepărtat, cantitate care trebuie să fie întotdeauna foarte mică.

Testul 2. În această experienţă se urmăreşte viteza de eliberare a ortofosfatului din ADP. Amestecul de reacţie conţine următorii componenţi (în μ moli) : tampon Tris cu pH 8,1—70—100 ; $MgCl_2$—5 ; ADP—10 ; şi enzimă. Volumul final este de 1,0 ml. Cantitatea de enzimă ce se utilizează este astfel calculată încît viteza de reacţie să rămînă liniară în tot timpul incubaţiei. Această cantitate este sub 1,5 unităţi, determinată prin testul 1. Incubaţia amestecului se face la 30° agitînd amestecul din care se iau două probe la 5 şi 15 min. Se defineşte unitatea enzimatică ca acea cantitate de enzimă care catalizează eliberarea unui μmol de ortofosfat în 15 min la 30°. Activitatea specifică este definită de raportul dintre unităţile enzimatice şi cantitatea de proteină, exprimată în mg.

Reacţia se opreşte cu acid tricloracetic, la fel ca în testul 1, iar ortofosfatul se determină prin metoda lui Lohman şi Jendrassik (1926). Viteza de eliberare a fosfatului este proporţională cu concentraţia enzimei între limitele de unităţi 0 şi 1,5 (testul 1). Atunci cînd enzima este liberă sau aproape liberă de adenilkinază, viteza de eliberare a fosfatului rămîne constantă pentru cel puţin o oră. În cazul prezenţei adenilkinazei este necesar să se calculeze viteza de reacţie din valoarea incubaţiei de la 5 minute.

Proprietăţile enzimei. *Efectul conservării, căldurii şi pH-ului.* Preparatele enzimatice recoltate în oricare etapă de purificare rămîn active chiar după un an dacă sînt păstrate la —18°C. Prin îngheţări şi dezgheţări repetate, enzima îşi pierde repede activitatea.

Cu toate că enzima este relativ stabilă la un pH acid (între 4,5 şi 5,5), ea nu poate fi păstrată prin îngheţare la acest pH ; ea pierde aproximativ 70% din activitate în timpul dezgheţării. Încălzirea la 50° 5 min la pH 5,8 distruge 50% din activitatea enzimatică. Dacă însă încălzirea este făcută la pH 6,4, pierderea activităţii este de numai 10 pînă la 20%. Enzima este complet distrusă prin încălzire 5 min la 60° şi la pH 5,6, sau 1 min la 100° şi la pH 7,4.

Scanned with OKEN Scanner

În condiţiile experimentale ale testului 1, încorporarea optimă a fosfatului este realizată la pH 8,1. La pH 6,4 activitatea ei este de 28%, iar la pH 10,0 de 50% din aceea manifestată în condiţiile optime.

În cazul testului 2, reacţia de eliberare a fosfatului are un platou de activitate maximă între pH 7,5 şi 9,0. La pH 6,4 activitatea este redusă cu 30%.

Constantele de afinitate. În condiţiile testului 1, sistemul este saturat la concentraţii de ADP de ordinul a $2{,}5 \times 10^{-3}$ M şi concentraţii de $MgCl_2$ între 1 şi 2×10^{-3} M. Concentraţiile corespunzătoare saturării pe jumătate a sistemului sînt de $2{,}5 \times 10^{-4}$ M şi respectiv 5×10^{-4} M.

În cazul testului 2, saturarea sistemului are loc la concentraţii mult mai ridicate de nucleozid-difosfaţi. Astfel concentraţiile de saturare a ADP sau IDP au fost de ordinul 10^{-1} M şi respectiv 5×10^{-2} M. Concentraţiile corespunzătoare saturării pe jumătate sînt $2{,}7 \times 10^{-2}$ M şi respectiv 10^{-2} M. Concentraţiile de $MgCl_2$ necesare pentru a satura sistemul testului 2 sînt aproximativ aceleaşi ca şi în cazul testului 1, adică între 1 şi 2×10^{-3} M. Concentraţia saturării pe jumătate pentru $MgCl_2$ este de 4×10^{-4} M. În timp ce în cazul testului 2 variaţiile mici ale raportului dintre concentraţia nucleozid-difosfatului şi ortofosfat nu par să influenţeze semnificativ viteza de reacţie, în testul 1 viteza de încorporare a ortofosfatului este evident influenţată. În acest caz, raportul optim al concentraţiei nucleozid-difosfatului faţă de ortofosfat a fost de 0,7 pentru ADP şi de 1,0 pentru IDP. Viteza de reacţie scade brusc dacă valoarea raportului este mai mare sau mai mică faţă de valoarea optimă.

Inhibitorii. După cum se remarcă din tabelul 35, fluorura de potasiu în cantitate de 0,4 M şi concentraţiile mici de arseniat (0,004 M) nu inhibă activitatea enzimei. Concentraţiile mai mari de arseniat (0,01 M) produc o inhibare de 44%. Aceşti inhibitori nu au nici un efect asupra eliberării ortofosfatului.

Un efect relativ redus a fost remarcat după adaosul de *p*-cloromercuribenzoat, fapt din care se poate deduce că grupele SH nu par să fie esenţiale pentru activitatea enzimei. Testul 1 a fost puţin afectat de prezenţa AMP, ATP sau a pirofosfatului. Este de remarcat că testul 1 este în general mai sensibil la inhibitori decît testul 2.

Prepararea şi izolarea polimerilor. Cu ajutorul polinucleotid-fosforilazei, izolată şi purificată după tehnica descrisă mai sus, se pot prepara polimeri care conţin unul sau mai multe tipuri de monomeri. De exemplu, din ADP se poate prepara acidul poliadenilic (poli-A); dintr-un amestec aproximativ echimolecular de ADP şi UDP se prepară acidul poli-AU; din amestecul molar de ADP, CDP, UDP şi CDP în proporţie de 1 : 0,5 : 1 : 1 se obţine poli-AGUC etc.

Amestecul de reacţie pentru sinteza polimerilor. a) Pentru sinteza unui omopolimer, amestecul de reacţie conţine (în μmoli pe ml) : tampon

Tris cu pH 8,1—50 ; $MgCl_2$—10 și 50 mg/ml din unul din următorii nucleozid-difosfați : ADP, IDP, UDP și CDP sau 25 mg/ml din GDP. Este de remarcat faptul că în cazul sintezei poli-G cantitatea de GDP întrebuințată este pe jumătate, în comparație cu aceea necesară pentru sinteza celorlalți polimeri.

Tabelul 34

Purificarea polinucleotid-fosforilazei din *Azotobacter vinelandii* * (după Grunberg-Manago și colab., 1956)

Etapa	Volumul	Unități (proba)	Proteina (mg)	Raportul ** 280/260	Activit. specifică (unit/mg proteină)	Randamentul (%)
Extract dializat	375	1 840	3 450	0,5	0,5	100
$(NH_4)_2SO_4$ (0,35—0,46)	95	1 750	810	—	2,2	95
Eluat de pe gel de $Ca(SO_4)_2$	58	1 500	142	0,7	10,6	82
$(NH_4)_2SO_4$ (0,45—0,55)	5	1 020	45	1,1	22,5	56

* 15 g de celule uscate cu acetonă au fost extrase cu o cantitate egală în greutate de alumină și 400 ml de KCl 0,15 M.

** Raportul absorbției luminii, la lungimile de undă A_{280} și A_{260}.

Tabelul 35

Efectul inhibitor al unor substanțe (după Grunberg-Manago și colab., 1956) *

Substanța testată	Concentrație molară	Inhibarea (%)	
		Testul 1	Testul 2
Arseniat de potasiu	0,004	7	0
Arseniat de potasiu	0,01	44	0
Fluorură de potasiu	0,04	13	0
p-cloromercuribenzoat	0,00015	27	18
2,4-dinitrofenol	0,0005	0	
AMP	0,01	10	0
ATP	0,002	10	
Pirofosfat de sodiu	0,01	18	

* Pentru primele cinci experiențe s-a folosit 0,037 mg de proteină (0,6 unități) cu activitate enzimatică specifică 16. Pentru ultimele trei s-a folosit 0,048 mg de proteină (0,58 unități) cu activitatea specifică 12. Condițiile standard de testare.

b) Pentru sinteza unui copolimer (mixt) de tipul poli-AU se iau aceleași cantități de tampon Tris și $MgCl_2$ ca cele arătate mai sus, la care se adaugă cîte 25 mg/ml din ADP și UDP.

c) Pentru sinteza copolimerului poli-AGUC se adaugă, în afara tamponului și $MgCl_2$, cîte 7 mg/ml din ADP, UDP și CDP și 3,5 mg/ml din GDP.

Scanned with OKEN Scanner

În cazul sintezei poli-G şi poli-AGUC se adaugă 2,5 mg/ml de enzimă cu o activitate specifică 9,5 (24 unităţi). Ca bacteriostatic, se introduce pentru fiecare probă cîte o picătură de toluen.

Volumul final este de 0,5 ml. Incubaţia se face la 30° agitînd continuu amestecul. Pentru determinarea eliberării ortofosfatului se prelevă cîte 0,02 ml. În general, după 6 ore de incubaţie sinteza atinge maximul de intensitate, după care stagnează.

Izolarea polimerilor sintetizaţi. Orice precipitat care la sfîrşitul perioadei de incubaţie este prezent în probe, se îndepărtează prin centrifugare la temperatură şi viteză mică. În soluţia limpede, răcită la 0°, se adaugă două volume de alcool etilic absolut şi se menţine amestecul la această temperatură, timp de o oră. Polimerul astfel precipitat se depune prin centrifugare la 0°, timp de 10 min, la 12 000 *g*. Supernatantul se decantează, iar precipitatul se dizolvă într-un volum minim de apă distilată. Polimerul este reprecipitat cu două volume de alcool etilic absolut, colectat şi dizolvat în apă ca mai sus. Orice material insolubil care poate apărea în această etapă este îndepărtat prin centrifugare.

Soluţia limpede şi incoloră se dializează faţă de apă distilată (care se schimbă de mai multe ori) în camera frigorifică (aproximativ 5°) timp

Tabelul 36

Date asupra sintezei diferiţilor polimeri (după Grunberg-Manago şi colab., 1956).

Nucleozid-difosfaţii (în mg)		Amestecul de reacţie *				Proporţia reacţiei ** (%)	Randament material liofilizat	Recuperare *** ca polinucleotid (%)
		Tampon Tris pH 8,1 (μM)	$MgCl_2$ (μM)	Enzimă (unităţi)	Volum total			
ADP	1 000	1 000	200	80	20	60	365	82
UDP	450	450	90	40	9	40	75	65
UDP	200	200	40	20	4	59	43	56
ADP + UDP****	180 + 180	360	72	32	7	46	88	87
ADP + UDP****	100 + 100	200	40	19	4	44	62	90—100
IDP	200	200	40	19	4	80	82	80
CDP	150	150	30	16	3	70	40	63
ADP + CDP	200 + 100	1 400	280	725	28	64	154	64
UDP + CDP	200 + 200	—	—	—	—	—	—	—

* Incubaţia la 30° cu agitare continuă, 40 pînă la 46 ore.

** Determinată din eliberarea ortofosfatului.

*** Calculată pentru următoarea compoziţie a difosfaţilor: ADP NaH_2, ADP $2H_2O$, GDP Na_3, GDP $3H_2O$; UDP Na_3, UDP $3H_2O$, CDP Na_3, CDP $4H_2O$, IDP Na_3, IDP $4H_2O$.

**** În aceste probe de UDP s-a făcut corecţia pentru prezenţa unei impurităţi anorganice.

de 48 de ore. După dializă, soluţia se evaporă şi produsul obţinut se păstrează în stare îngheţată.

Redăm în tabelul 36 detaliile amestecului de reacţie pentru prepararea diferitelor tipuri de ARN sintetici.

EXTRACŢIA ŞI PURIFICAREA POLIMERAZEI ARN
(după Chamberlin şi Berg, 1962)

Celulele. Celulele de *E. coli B* au fost obţinute în cultură continuă exponenţială într-un mediu care conţinea glucoză şi săruri minerale. Celulele conservate la —20° şi-au păstrat activitatea enzimatică timp de 6 luni.

Procedeul de purificare şi rezultatele unei preparări tipice sînt sumarizate în tabelul 37. Toate operaţiile se execută la +4°C. Centrifugarea se face în toate cazurile la 30 000 *g* 15 min.

Tabelul 37

Purificarea polimerazei ARN din *E.coli*

Fracţiunea	Volum	Activitatea specifică (unităţi/mg)	Activitatea totală (unităţi)
Extractul iniţial	260	40	370 000
Eluatul protaminic	37	1 600	205 000
Sulfatul de amoniu	5	2 500	200 000
Fracţiunea eluată de pe DEAE	2	6 100	153 000

Extracţia. 140 g celule bacteriene se introduc într-un omogenizator Waring Blendor împreună cu 420 g de perle de sticlă şi 150 ml tampon A, care conţine Tris 0,01 M cu pH 7,9, Cl_2Mg 0,01 M şi EDTA 0,0001 M. După 15 min de omogenizare la turaţie mare, celulele sînt distruse. Se adaugă din nou 150 ml de tampon A şi se lasă să se sedimenteze fragmentele de sticlă. Lichidul supernatant se decantează, iar reziduul se spală cu 75 ml de tampon A.

Lichidul supernatant se amestecă cu lichidul de spălare şi apoi se centrifughează 30 min. Supernatantul obţinut formează fracţiunea I.

Fracţionarea cu streptomicină-protamină. Fracţiunea I se centrifughează în ultracentrifugă 4 ore la 30 000 t/m. Concentraţia proteinei este astfel potrivită cu ajutorul tamponului A încît soluţia să cuprindă aproximativ 12 mg/ml. Se adaugă β-mercaptoetanol pînă la concentraţia finală de 0,01 M.

Scanned with OKEN Scanner

La 350 ml de soluţie supernatantă diluată se adaugă, agitînd continuu, 17,5 ml soluţie de sulfat de streptomicină 10% (greutate/volum).

După 15 min, soluţia se centrifughează şi la 350 ml de lichid supernatant se adaugă 14,0 ml de sulfat de protamină 1%.

Precipitatul se colectează prin centrifugare, se spală suspendîndu-l în 175 ml de tampon A care conţine mercaptoetanol 0,01 M.

Precipitatul spălat se suspendă în 35 ml de tampon A care mai conţine β-mercaptoetanol 0,01 M şi sulfat de amoniu. Se centrifughează 30 min, iar lichidul supernatant care se colectează reprezintă fracţiunea a II-a.

Fracţionarea cu sulfat de amoniu. La 37 ml din fracţiunea a II-a se adaugă 15,8 ml de soluţie de sulfat de amoniu (saturată la 25°C şi ajustată la pH 7 cu hidroxid de amoniu). Amestecul se agită 15 min, iar precipitatul ce se obţine se îndepărtează prin centrifugare. La lichidul supernatant se adaugă 16,2 ml de soluţie saturată de sulfat de amoniu. După 15 min, precipitatul se colectează prin centrifugare 30 min. Precipitatul se dizolvă în 5 ml tampon B (K_2HPO_4, 0,002 M, cu pH 8,2, $MgCl_2$ 0,01 M, β-mercaptoetanol 0,01 M şi EDTA 0,0001 M), obţinîndu-se astfel fracţiunea a III-a.

Adsorbţia şi eluţia de pe DEAE-celuloză. Fracţiunea a III-a se diluează pînă la o concentraţie finală în proteină de aproximativ 3 mg/ml, cu ajutorul tamponului B şi se trece printr-o coloană de DEAE-celuloză (10 cm × 1 cm^2 spălată în prealabil cu 150 ml de tampon B). Viteza de scurgere este de aproximativ 0,5 ml pe minut. Coloana se spală cu 10 ml de tampon B şi apoi cu acelaşi tampon care conţine însă KCl 0,16 M pînă la scăderea absorbanţei la 280 mμ mai puţin de 0,05. Enzima se eluează de pe o coloană cu tamponul B şi KCl 0,23 M. Activitatea enzimei se găseşte în primii 5 ml ai acestui eluant care reprezintă fracţiunea a IV-a.

Proprietăţile enzimei purificate. Activitatea specifică a fracţiunii a IV-a este de 140 pînă la 170 de ori mai mare decît a extractului iniţial. Purificarea descrisă mai sus este reproductibilă. Activitatea specifică a fracţiunii a IV-a este cuprinsă între 5 500 şi 6 100. Preparatul enzimatic (fracţiunea a IV-a) are raportul absorbanţei la 280 şi 260 mμ egal cu 1,5.

Fracţiunea a IV-a păstrată între 0° şi 2° îşi menţine mai bine de 90% din activitate timp de două săptămîni şi 40—60% din activitate dacă este păstrată mai mult de o lună. Fracţiunile enzimatice I, II şi III sînt instabile, pierzîndu-şi peste 30% din activitate dacă sînt păstrate peste noapte în diferite condiţii. Întrucît fracţiunile amintite sînt instabile, se recomandă ca purificarea produsului să fie făcută într-un singur timp, fără întreruperi la etapele intermediare.

Încercarea activităţii polimerazei ARN. Activitatea polimerazei se determină măsurînd conversiunea ribonucleotid-trifosfaţilor marcaţi (C^{14} sau P^{32}), într-o formă acid-insolubilă.

Se consideră o unitate de activitate, activitatea enzimei care corespunde unei încorporări de 1 mμ mol de CMP^{32} într-o oră în condițiile experimentale arătate mai jos.

Diluțiile enzimei se fac într-o soluție care conține: tampon Tris 0,01 M cu pH 7,9, $MgCl_2$ 0,01 M, β-mercaptoetanol 0,01 M, EDTA 5×10^{-5} și 1 mg/ml de albumină cristalizată din ser de bovine.

Amestecul de reacție conține (în 0,25 ml) : 10 μmoli de tampon Tris cu pH 7,9, 0,25 μmoli de $MgCl_2$, 1,0 μmol de $MgCl_2$, 100 μmol din ATP, CTP, GTP și UTP, 250 μmoli de ADN din spermă de somn, 3,0 μmol de β-mercaptoetanol și 10 pînă la 80 unități de enzimă.

Unul din trifosfați este marcat cu aproximativ 300 pînă la 600 i. p. m. pe mμmol. După incubație la 37°, timp de 10 min, amestecul de reacție se răcește în gheață și se adaugă mai întîi 1,2 mg de albumină serică (0,03 ml), apoi 3 ml de acid percloric 3,5% răcit. Precipitatul se depune prin centrifugare în 5 min la 15 000 *g* și se spală de 2 ori cu cîte 3 ml de acid percloric rece.

Reziduul se suspendă în 0,5 ml de NH_4OH 2 N și i se determină radioactivitatea.

Întrucît radioactivitatea încorporată reprezintă numai una din cele 4 nucleotide, încorporarea observată se va multiplica cu 3 pînă la 5 pentru a avea cantitatea totală de ARN sintetizată.

Factorul exact depinde de compoziția ADN întrebuințat ca „primer".

Condițiile optime de reacție. În prezența enzimei purificate, sinteza ARN depinde de prezența moleculelor de ADN, a cationilor bivalenți și a celor patru trifosfați (tabelul 38).

Tabelul 38

Substanțele necesare pentru sinteza acidului ribonucleic (după Chamberlin și Berg, 1962)

Componente	Încorporarea CMP^{32} (mμmoli)
Sistemul complet	7,3
minus Mn^{++}	4,3
minus Mg^{++}	5,6
minus Mg^{++} și Mn^{++}	0,03
minus ADN	0,03
minus ATP, GTP, UTP	0,09
minus enzima	0,03

Omiterea β-mercaptoetanolului din amestecul de reacție face ca activitatea enzimei să scadă; pH-ul optim al reacției este situat între 7,8 și 8,2. La pH 6,1 și 8,9 activitatea este redusă la 13, 62 și 84 la sută, din activitatea maximă a enzimei.

Scanned with OKEN Scanner

Prezența trifosfaților. Pentru sinteza ARN sînt necesari toți ribonucleozid-trifosfații; dezoxiribonucleozid-trifosfații nu pot îndeplini funcția de substrat al reacției. Reacția poate avea loc și în prezența difosfaților, însă viteza de reacție este foarte mult redusă. Este posibil ca activitatea difosfaților să se datoreze impurificării lor cu mici cantități de trifosfați sau formării în cursul reacției a trifosfaților, prin acțiunea nucleozid-difosfatkinazei.

Prezența ionilor. Adăugați separat, concentrațiile optime pentru ionii Mn^{2+} și Mg^{2+} sînt de 2×10^{-3} M și respectiv 8×10^{-3} M.

Prepararea acidului poliadenilic. Sinteza acidului poli-A din ATP are loc în prezența ADN, a cationilor bivalenți și a enzimei purificate (tabelul 39). Este de notat faptul că adăugarea ADP determină o slabă diluție a încorporării ATP (C^{14}). Viteza de încorporare este direct proporțională cu cantitatea de enzimă adăugată.

Tabelul 39

Sinteza acidului poliadenilic (după Chamberlin și Berg, 1962)

Sistemul	Încorporarea AMP
Complet (ATP-ul fiind singurul trifosfat)	9,9
minus ADN	0,03
minus Mn	2,5
minus Mg	8,7
plus RN-ază	6,9
plus DN-ază	0,3
plus ADP	7,6

Amestecul de reacție conține în 0,25 ml: 10 μmoli de Tris cu pH 7,85, 0,5 μmoli de $MnCl_2$, 2 μmoli $MgCl_2$, 3 μmoli de β-mercaptoetanol, 100 μmoli de ATP-C^{14}, 280 mμmoli de ADN din timus de vițel și 3 μg de fracțiune IV. RN-aza pancreatică și DN-aza s-au adăugat în cantitate de 25 μg, iar ADP-ul în cantitate de 100 mμ moli. Timpul de incubație: 10 min la 37°.

PURIFICAREA POLIMERAZEI ARN VIRALE
(după August Schapiro și Eoyang, 1965)

10 g de *E. coli* infectate cu fagul SU_{11} înghețate, se mojarează cu 20 g de alumină. Pasta rezultată se suspendă în 80 ml de soluție conținînd tampon Tris 0,02 M cu pH 8,5, β-mercaptoetanol 0,01 M, EDTA 0,015 M și 50% glicerol. Suspensia se centrifughează la 30 000 *g* 10 min, iar reziduul se elimină. Soluția supernatantă (84 ml) se centrifughează apoi la 151 000 *g*, 60 min. Lichidul supernatant (80 ml) se decantează și se diluează

cu o cantitate egală în volum de apă. Imediat apoi se adaugă, amestecînd, 0,1 volum de spermină —HCl 0,1 M. Suspensia care se formează se centrifughează la 30 000 *g*, 10 min, iar soluţia supernatantă se îndepărtează. Precipitatul, suspendat în 40 ml de 0,1 M glicină—KOH pH 10,0 în glicerol 30%, se adaugă imediat peste o soluţie proaspăt preparată care conţine 40 ml de sulfat de dextran-500 sodat 20%, 12 ml polietilenglicol 20% (g/g), 0,2 ml de $MgCl_2$ M, 0,8 ml de β-mercaptoetanol 14 M şi 108 ml de tampon glicină — KOH 0,05 M pH 9. Apoi s-a mai adăugat, amestecînd, 4 g de Li Cl, iar suspensia formată s-a centrifugat imediat la 30 000 *g* 10 min. Precipitatul este decantat şi soluţia supernatantă (106 ml) se aduce la 20% saturaţie cu sulfat de amoniu solid. Precipitatul, colectat prin centrifugarea la 30 000 *g* 10 min, este dizolvat în 20 ml de soluţie, care conţinea tampon Tris 0,002 M cu pH 8,5, β-mercaptoetanol 0,01 M, EDTA 0,0015 M şi glicerol 20%.

Această soluţie este apoi dializată, timp de 3 ore, faţă de tampon de fosfat de potasiu 0,05 M, cu pH 6,0 în glicerol 20%. Fracţiunea enzimei dializată şi diluată cu un volum egal de tampon fosfat potasiu 0,05 M cu pH 6,0 în glicerol 20% este trecută printr-o coloană cu dimensiunile de 2,5 × 12 cm încărcată cu fosfat de celuloză. Coloana se spală cu acelaşi tampon iar fracţiunile cu activitatea cea mai mare se colectează. Enzima se precipită prin adaos de sulfat de amoniu solid pînă la obţinerea a 60% saturaţie. Precipitatul este apoi dizolvat în 2 ml de soluţie compusă din tampon Tris 0,02 M cu pH 8,5, β-mercaptoetanol 0,01 M, EDTA 0,0015 M şi glicerol 20%.

Schema procesului de purificare este prezentată în tabelul 40.

Tabelul 40

Purificarea polimerazei virale (după August şi colab., 1965)

Fracţiunea enzimatică	Unităţi (mμmoli/5 min)	Activitatea specifică (mμ moli/5 min/mg proteină)
Extract alumină	750	1,8
Soluţia supernatantă obţinută prin centrifugarea la turaţie ridicată	860	2,5
Precipitatul cu spermină	908	9,0
Fracţiunea polimer	450	51,0
Eluatul de pe celuloză-fosfat	235	220,0

Cîteva precauţii sînt necesare pentru a asigura succesul acestui procedeu de purificare. Astfel, enzima se inactivează repede prin încălzire. Prin urmare, pentru ca fracţiunile să rămînă active în timpul procedeului de lucru, ele se menţin la 0—2°C. Împiedicarea încălzirii produsului de către aparatul de agitare folosit pentru dializă, se realizează răcind totul pe o baie de gheaţă.

Scanned with OKEN Scanner

Fracţiunea similară cu aceea obţinută prin procedeul descris, extrasă din bacterii neinfectate, este lipsită de activitate enzimatică, atunci cînd este controlată prin testul de determinare a activităţii standard a polimerazei virale.

Tabelul 41

Condiţii pentru încorporarea GMP

Sistem	Încorporarea GMP (mμmoli/min)
Complet	72,5
Minus $MgCl_2$	3,2
Minus CTP, UTP şi ATP	2,5
Minus CTP, UTP şi ATP plus dCTP, dTTP şi dATP	1,7
Minus (C^{14}) GTP plus (C^{14}) GTP	1,0
Minus CTP, UTP şi ATP plus CDP, UDP şi ADP	3,9
Minus (C^{14}) GTP plus (C^{14}) GDP	1,9
Minus ARN	6,6
Minus DN-ază plus RN-ază (10μg)	0,8
Minus ARN şi DN-ază plus ADN de timus	10,1
Minus DN-ază	71,6
Minus 2-mercaptoetanol	71,0
Plus 2-fosfoenol-piruvat şi piruvatkinază	73,2
Plus actinomicină (25μg)	74,1

Cu o enzimă parţial purificată, sinteza ARN a fost dependentă de adaosul la amestecul de reacţie a ARN, $MgCl_2$ şi a celor patru ribonucleozid-trifosfaţi. Adiţia la amestecul de reacţie de *2*-fosfoenolpiruvat, DN-ază (50 μg) şi actinomicină D (25 μg) nu influenţează reacţia. În schimb, 0,02 μg de RN-ază o inhibă aproape complet (tabelul 41).

Pentru sistemul complet, procedeul standard de încercare a activităţii enzimatice întrebuinţează (C^{14}) GTP ($8{,}0 \times 10^6$ i/min/μmol) şi 3 μg din proteina fracţiunii 4, în fiecare tub. Abaterile de la sistemul complet au fost arătate în tabelul 41. Cincizeci de mμmoli din fiecare dezoxiribonucleozid-trifosfaţi sau ribonucleozid-difosfaţi, 20 mμmoli de (C^{14}) dGTP, 20 mμmoli de (C^{14}) GDP, 50 mμmoli de ADN din timus şi 1 μ mol de *2*-fosfoenolpiruvat şi 1 μg de piruvatkinoză. RN-ază şi actinomicina D s-au adăugat în cazurile arătate în tabelul 41.

Condiţiile standard pentru sinteza ARN sînt (C^{14}) GTP ($7{,}2 \times 10^6$ i/min μ mol), ARN din *E. coli* şi 20 μg din proteina fracţiunii 4. Reacţia se opreşte după 5 min la 37°C prin adăugarea de 2 ml acid tricloracetic 5%, care conţinea pirofosfat 0,02 M. Materialul acid-insolubil se spală o dată cu acid tricloracetic 5% (cu 0,02 M pirofosfat) şi apoi de trei ori cu $HClO_4$ 1%. Precipitatul se dizolvă în 1 ml de KOH 0,3 M sau $HClO_4$ 1,0 N sau în tampon Tris 0,05 M, cu pH 7,5 şi $MgCl_2$ 0,01 M. Pentru ana-

Scanned with OKEN Scanner

liză, produsul s-a tratat cu DN-ază sau RN-ază, după cum este indicat în tabelul 42, timp de 20 minute la 37°.

Autorii precizează că fracţiunea enzimatică cu gradul de puritate cel mai avansat determină într-o mică măsură încorporarea trifosfaţilor

Tabelul 42

Efectul diferiţilor agenţi asupra produsului sintetizat
(după August şi colab., 1965)

Tratament	Materialul radioactiv acid-insolubil (i.p.m.)
Niciunul (martor)	1 584
KOH (0,3 M, 18 ore)	7
$HClO_4$ (1,0 N, 15 min la 100°)	8
DN-ază (10μg)	150
RN-ază (10μg)	472
Încălzirea (100°C, 5 min) şi RN-ază (10μg)	150

în prezenţa ADN sau în lipsa ARN. În schimb, în prezenţa diferiţilor ARN încercaţi ca primeri, încorporarea a avut loc cu o intensitate variabilă în funcţie de natura ARN. Cele mai bune rezultate s-au obţinut cu ARN ribozomali bacterieni, ARN virali şi cu unii ARN solubili.

Sinteza neenzimatică a unor nucleozide şi polinucleotide (după Schramm şi colab., 1962)

Prepararea adenozinei (N(9)—(1′—β—Ribozil)-adenina). 1 g de adenină se dizolvă agitînd magnetic cu 0,5 ml HCl conc. în 100 ml. de dimetilformamidă (conţinut de apă 0,2%). Se adaugă apoi 3—4 g de esteri polifosforici (vezi mai jos) şi încet picătură cu picătură 50 ml de formamidă care conţine 200 mg de riboză.

După 22 de ore de reacţie, pe o baie de glicerină la 50°C, dimetilformamida este distilată în vid. Reziduul umed obţinut se reia cu puţină apă, se aduce la pH 7 şi se lasă timp de 3 ore la răcitor. În aproximativ 3 ore, o parte din adenina neintrată în reacţie precipită. Soluţia se filtrează, se aduce cu NH_3 la pH 11,0 şi apoi se fracţionează pe o coloană de Dowex-1 — formiat X_{10}. Se obţin în acest fel fracţiuni individualizate de adenozină, adenină şi acid adenilic.

Prepararea acidului poliadenilic din 2′ şi 3′ monofosfaţi. 350 de mg de acid adenilic şi 8 g de esteri polifosforici se încălzesc la 55°C, 18 ore pe o baie de ulei amestecînd continuu. După răcirea produsului, acesta se dizolvă în 50 ml de apă şi se dializează faţă de apă ce conţine $NaHCO_3$ pentru a îndepărta ortofosfatul eliberat şi oligonucleotidele cu greutate moleculară mică. Apoi, prin uscarea la rece a soluţiei dializate s-a obţinut acidul poliadenilic sub formă de pulbere albă cu randament de 20%.

Prepararea esterilor polifosforici (EPF). Se fierb cu reflux 150 g de P_2O_5 p. a. împreună cu 150 ml de cloroform şi 300 ml de eter pînă cînd se obţine o soluţie clară. Aceasta se realizează în aproximativ 12 ore. Apoi se evaporă solventul iar reziduul vîscos şi incolor obţinut se poate întrebuinţa direct la sinteză.

Reacţia acidului ribonucleic cu agenţii chimici

REACŢIA CU HIDROXIL-AMINA
(după Schuster şi Wittmann, 1963)

O soluţie de ARN cu un conţinut de 1 mg/ml se tratează (la $20 \pm 0{,}5^0$) cu NH_2 OH HCl 1 M la pH 6,1 şi 9,1. Înainte de amestecarea celor două soluţii, pH-ul se ajustează la valoarea 6,1 şi 9,1 cu ajutorul NaOH. Din amestecul de reacţie se iau apoi din timp în timp probe de ARN care se purifică de excesul de NH_2OH prin precipitări repetate cu etanol. Proba se precipită cu 3 volume de etanol 96% care conţine ioni de acetat, răcit în prealabil la —10°C. Urmează o centrifugare de 2-4 min la 3 000 t/min, timp în care precipitatul devine floculent (de obicei în 2 min).

Sedimentul se redizolvă în tampon fosfat 0,01 M pH 6,1 (respectiv tampon fosfat 7,5 corectat cu alcali la pH 9,1), repetîndu-se precipitarea cu alcool.

Final, ARN se dizolvă în tampon fosfat 0,01 M, concentraţia acidului nucleic ajustîndu-se la 1 mg/ml. În general, după reacţie, ARN conţine mai puţin de 10^{-3} M NH_2OH. Pentru testul biologic se utilizează o soluţie de ARN de aproximativ 20-40 μg/ml, care a fost îngheţată la —25°C cu un amestec de acetonă şi gheaţă.

În fiecare experienţă pH-ul soluţiilor, inclusiv al alcoolului, se aduc la valorile menţionate (6,1 şi 9,1) pentru ca ARN să nu reacţioneze cu NH_2 OH la alt pH decît cel dorit.

Ca martori se iau probe de ARN identice cu cele arătate mai sus cu singura deosebire că în loc de tratamentul cu NH_2OH ele sînt tratate cu

NaCl 1M. Martorii s-au ţinut la pH 6,1, 7,5 şi 9,1 diferite perioade de timp pentru a se cunoaşte variaţia activităţii biologice în funcţie de timp şi pH.

Autorii menţionează că în condiţiile experimentale recomandate de ei s-a observat precipitarea ARN cu NaCl 1 M.

REACŢIA CU FORMALDEHIDĂ

a) **Determinarea fracţiunii moleculei de ARN libere.** Grupele aminice libere ale ARN reacţionează lent cu HCHO la temperatura de 22-24°C. Reacţia se urmăreşte spectrofotometric prin determinarea absorbţiei soluţiei de ARN plus HCHO la 245, 270, 275 şi 280 mμ. Haselkorn şi Doty (1961) recomandă următoarele condiţii de reacţie : 2,6 ml de ARN cu concentraţie de $3{,}75 \times 10^{-5}$M se tratează cu 0,1 ml de HCHO 8%. Soluţia de ARN se face în tampon fosfat cu forţa ionică de 0,25 şi pH 6,8. Amestecul se păstrează la 24°C. Din timp în timp se determină valorile densităţii optice a soluţiei pentru lungimile de undă menţionate.

Este important de specificat că valorile de la 245 mμ arată efectul de denaturare. Creşterea absorbţiei la această lungime de undă nu trebuie să depăşească 5-10% (în general 5%).

Cifrele spectrale obţinute imediat după amestecarea soluţiilor permit caracterizarea stării „helix". Valorile înregistrate în momentul în care reacţia a fost totală caracterizează starea „helix + HCHO". În cazul ARN din VMT, reacţia totală a avut loc după 85 de ore de păstrare a amestecului la 24°C. Reacţia rapidă a HCHO cu grupele aminice angajate în legături de hidrogen se stabileşte prin ridicarea temperaturii soluţiei la 70° şi măsurîndu-se spectrul la această temperatură. Valorile spectrale astfel citite caracterizează starea de „ghem + HCHO". În sfîrşit, încălzirea timp de 10 min la 90°C a unei porţiuni din soluţia iniţială de ARN şi citirea absorbţiei la această temperatură dă valorile necesare pentru definirea stării de „ghem". Fracţiunea (F) a moleculei de ARN cu grupări aminice libere se calculează din relaţia :

$$F = \frac{[\text{helix} + \text{HCHO}] - [\text{helix}]}{[\text{ghem} + \text{HCHO}] - [\text{ghem}]}$$

Pentru ARN din VMT fracţiunea liberă a moleculei este de aproximativ 0,3, iar 0,7 reprezintă zona ordonată.

b) **Determinarea temperaturii de tranziţie a ARN**, după Popa şi Portocală (1966). În mod obişnuit tranziţia termică a ARN se determină cu ajutorul unui spectrofotometru echipat cu un sistem de termostatare a cuvelor. Autorii recomandă utilizarea HCHO 0,4% în acelaşi scop. Avantajul principal al metodei rezultă din faptul că în acest caz determinarea se poate realiza fără echipament de termostatare : acidul nucleic (ARN sau ADN) se dizolvă în NaCl 0,14 M cu un conţinut de 0,015 citrat de sodiu

Scanned with OKEN Scanner

(SSC) astfel ca soluţia să conţină 15-20 μg ARN/ml. În această soluţie se introduce HCHO în concentraţie finală de 0,4 %. Pentru determinarea temperaturii de tranziţie au ajutorul HCHO se recomandă două variante:

1) *Varianta discontinuă.* Probe de cîte 2 ml din soluţia de acid nucleic la care s-a adăugat cantitatea menţionată de HCHO se introduc în eprubete de 100 × 10 mm închise cu dopuri. Acestea se încălzesc cîte 10 min la temperaturi cuprinse între 30 şi 100°C în trepte de cîte 5°C în cazul ARN şi 2,5°C în cazul ADN. Fiecare probă se răceşte brusc la 0°C, iar absorbanţa ei (la 260 mμ) se determină după ce a atins temperatura camerei. Citirile se fac faţă de soluţii martor (care conţin toate componentele cu excepţia acidului nucleic) încălzite şi răcite în aceleaşi condiţii.

2) *Varianta continuă.* În acest caz se foloseşte o singură probă de acid nucleic (3 ml) care se încălzeşte şi răceşte ca mai sus progresiv la toate temperaturile stabilite. După scurgerea fiecărei perioade de încălzire (10 min la o anumită temperatură), proba se răceşte brusc la 0°C, se aduce la temperatura camerei şi se examinează la spectrofotometru. Se reia apoi încălzirea la treapta următoare şi aşa mai departe pînă cînd se epuizează toate punctele de încălzire.

Valorile absorbanţei relative înregistrate pe un grafic în funcţie de temperatura de încălzire a soluţiei dau curbe de tranziţie termică carcateristice produsului analizat.

Menţionăm că polinucleotidele bicatenare îşi măresc brusc absorbanţa la 260 mμ în jurul temperaturii lor mijlocii de topire (80-90°C) în timp ce polinucleotidele monocatenare prezintă o creştere gradată a absorbanţei lor simultan cu ridicarea temperaturii (vezii structura secundară).

REACŢIA CU ACIDUL AZOTOS

Două volume de ARN se tratează cu un volum de $NaNO_2$ 4 M şi un volum de acetat de sodiu 1 M. Amestecul se aduce la pH 4,5 şi apoi se introduce într-o baie de apă fixată la 20°C. Probele de control conţin NaCl 4 M în loc de $NaNO_2$ 4 M. După diferiţi timpi de incubare se amestecă două părţi din soluţia de ARN cu trei părţi de PO_4H_2K 0,5 M. ARN se precipită cu alcool etilic saturat cu NaCl. Precipitatul obţinut se spală cu 15 ml de amestec format din două volume de alcool 95 % şi un volum de fosfat 0,02 M.

Final ARN se dizolvă într-un volum de fosfat 0,02 M egal cu acela al soluţiei care a fost amestecată cu fosfatul 0,5 M.

Anderson N. G., Lodd E. (1962), Biochim. Biophys. Acta, **55**, 275.
August J. T., Shapiro L., Eoyong Z. (1965), J. mol. Biol., **11**, 257.
Bendich A. (1955), în *Nucleic acids*, Academic Press, vol. I, p. 81.

Scanned with OKEN Scanner

Bendich A. (1957), în *Enzymology*, Academic Press, vol. III, p. 721.
Berenblum I., Chain E. (1938), Biochem. J., **32**, 295.
Blazsek V., Bukaresti L. (1962), Biochim. biophys. Acta, **61**, 970.
Boulanger P., Montreuil I. (1951), Bull. Soc. Chim. Biol., **33**, 784.
Brown D. M., Magrath D. J., Todd A. R., (1952), J. Chem. Soc., 2 708.
Brown D. M., Fried M., Todd A. R. (1955), J. Chem. Soc., 2 208.
Burton R. K. (1955), Biochem. J., **61**, 473.
Burton R. K. (1956), Biochem. J., **62**, 315.
Cardini C. E., Leloir R. L. (1957), în *Enzimology*, Academic Press, vol. III, p. 844.
Chamberlin M., Berg P. (1962), Proc. Nat. Acad. Sci., U.S., **48**, 81.
Cohn W. E. (1948), Science, **109**, 377.
Davidson J. N., Leslie J., Waymouth C. (1949), Biochem. J., **44**, 5.
Delory G. E. (1938), Biochem. J., **23**, 1 161.
Dische Z. (1930), Mikrochemie, **8**, 4.
Fiske C. H., Subbarow Y. (1925), J. Biol. Chem., **66**, 375.
Fraenkel-Conrat H., Olcott H. S. (1945), J. Biol. Chem., **161**, 259.
Fraenkel-Conrat H., Singer B., Tsugita A. (1961), Virology, **14**, 54.
Gierer A., Schramm G. (1956), Nature, **11**, 138.
Grunberg-Manago M., Oritz P. J., Ochoa S. (1956), Biochim. biophys. Acta, **20**, 269.
Harshaw J. P., Brown R. A., Graham A. F. (1962), Anal. Biochem., **4**, 182.
Hartman D. (1961), *Disertație*, Universitatea tehnică, Berlin.
Haselkorn R., Doty P., (1956), J. biol. Chem., **236**, 2 738.
Heppel A. L., Oritz J. P., Ochoa S. (1957), J. biol. Chem., **239**, 679.
Hyndman L. A., Burris K. H., Wilson P. W. (1953), J. Bacteriol., **65**, 522.
Ishihama A., Mizuno N., Takai M., Otaka E., Osawa S. (1962), J. mol. Biol., **5**, 251.
Katz S., Comb D. (1963), J. biol. Chem., **9**, 238.
Kunitz M. (1940), J. gen. Physiol., **24**, 15.
Littauer U. Z., Kornberg A., citați după Zubay (1962).
Lohmann K., Jendrassik L. (1926), Biochem. Z., **178**, 419.
Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Forr A. L., Rondall R. J. (1951), J. biol. Chem., **192**, 265.
Mahler H. R., Da Silva Pereira A. (1962), J. mol. Biol., **5**, 325.
Mandell J. D., Hershey A. D. (1960), Anal. Biochem., **1**, 66.
Marshak A., Vogel H. J. (1951), J. Biol. Chem., **189**, 597.
Markham R., Smith J. (1951),Biochem. J., **49**, 401.
Markham R., Smith J. (1952), Biochem. J., **52**, 552.
Mathson G. G. (1909), Biochem. J., **4**, 233.
Maver M. E., Greco A. J. (1956), J. Nat. Cancer. Inst., **17**, 503.
Mejbaum W. (1939), J. Physiol. Chem., **258**, 117.
Michel H. (1963). Naturwiss., **40**, 390.
Miller J. (1953), Analyt. Chemistry, **31**, 964.
Miura K. J. (1962), Biochim. Biophys. Acta, **55**, 196.
Ogur M., Rosen G. (1950), Arch. Biochem., **25**, 262.
Oritz J. P., Ochoa S. (1959), J. biol. Chem., **5**, 1 208.
Pons M. (1964), Virology, **24**, 467.
Popa L., Lăcătuș V. (1966), lucrare în curs de publicare.
Popa L., Portocală R. (1966), St. cerc. Biochim., **1** (sub tipar).
Popa L., Cruceanu A., Portocală R. (1966), *A III-a Conferință Republicană de Chimie*, Timișoara (sub tipar).
Popa L. (1961), St. cerc. biochim., **1**, 215.
Popa L. (1964), Disertație, Politehnica din Timișoara.
Portocală R., Boeru V., Samuel I. (1959), St. cerc. Inframicrob., **10**, 51.
Portocală R., Andreescu M. (1961), St. cerc. inframicrob., **12**, 77.
Portocală R., Popa L. (1964), St. cerc. Biochim., **7**, 337.
Rosenbaum M., Brown R. A. (1961), Anal. Biochem., **2**, 15.
Schmidt G., Tanhauzer S. J. (1945), J. biol. Chem., **161**, 83.
Schneider W. C. (1945), J. biol. Chem., **161**, 293.

Scanned with OKEN Scanner

Tabel anexă

Unele constante principale ale componentelor acizilor ribonucleici

Denumirea	Formula chimică	Greutate moleculară	Extincţia molară
Adenina	$N : CHNHC : C.N : CHN : CNH_2$	135,14	12 900 la 262 mμ, pH 10.
Adenozina	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	267,25	15 100 la 259 mμ, pH 7,0.
Acid adenozin-*2′(3′)*-monofosforic (izomerii amestecaţi)	$C_{10}H_{12}O_3N_5OPO_3H_2H_{20}$	365,26	15 300 la 260 μm, pH 7,0.
Acid adenozin-*5′*-monofosforic	$C_{10}H_{12}O_3N_5OPO_3H_2$	347,24	15 300 la 260 mμ, pH 7,0.
Acid adenozin-*5′*-difosforic (sare de litiu)	$C_{10}H_{13}N_5O_{10}P_2Li_2$	439,07	15 300 la 260 mμ, ph 7,0.
Acid adenozin-*5′*-trifosforic (sare de sodiu)	$C_{10}H_{14}N_5O_{13}P_3Na_{24}H_2O$	623,23	15 400 la 260 mμ, pH 7,0.
Guanina	$C_5H_5N_5O$	151,14	11 000 la 248 mμ, pH 1,0.
Guanozina	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	283,25	13 300 la 252,5 mμ, pH 7,0.
Acid guanozin-*2′* (*3′*)-monofosforic (amestec de izomeri)	$C_{10}H_{14}N_5O_8P$	363,24	13 200 la 252 mμ, pH 7,0.
Acid guanozin-*5′*-monofosforic (sare de sodiu)	$C_{10}H_{12}N_5O_8PNa_2H_{20}$	425,2	
Citozina	$C_4H_5ON_3H_{20}$	129,12	10 190 la 275 mμ, pH 1,0.
Citidina	$C_9H_{13}O_5N_3$	243,23	12 740 la 280 mμ, pH 1,0.
Acidul *2′*, *3′*-citidilic ciclic (sare de sodiu)	$C_9H_{11}O_7N_3PNa$	327,17	—
Acid citidin-*5′*-monofosforic	$C_9H_{14}O_8N_3P\ H_2O$	341,22	12 700 la 280 mμ, pH 2,0.
Acid citidilic (acid *2′* (*3′*)-citidin-monofosforic, amestec de izomeri)	$C_9H_{14}N_3O_8P$	323,21	12 800 la 280 mμ, pH 2,0
Uracil	$CH : CH\ CO\ NH\ CO\ NH$	112,09	8 000 la 260 mμ, pH 7,0.
D (—) Riboza	$CH_2\ (CH\ OH)_4\ O$	150,14	
Acid ortofosforic	H_3PO_4	98,00	
Acid pirofosforic	$H_4P_2O_7$	177,99	
Acid ribonucleic din drojdie	Conţinut în azot (N) 14,5	Conţinut în fosfor $(P)_8$	Raport N/P = = 1,81
Acid ribonucleic înalt polimerizat din drojdie	„ 14,0	8,0	N/P = 1,75 (EP) mai mic de 9 000
Greutatea moleculară medie a bazelor		131,88	
Greutatea moleculară medie a nucleotidelor		343,97	

Scanned with OKEN Scanner

Redactor responsabil: Dr. EUGEN PĂUNESCU
Tehnoredactor: CONSTANTIN STANCIU

Dat la cules 20.04.966. Bun de tipar 23.07.1966. Apărut 1966. Tiraj 2520 Hîrtie scris I A 70×100 de 80 g/m². Coli editoriale 27,73 coli de tipar 23,50. 8 planşe tipo. A. 4760/1966. C.Z. pentru bibliotecile mari 577.1:547.963.32. C.Z. pentru bibliotecile mici 577.1:547

Întreprinderea Poligrafică „Informaţia", Str. Brezoianu nr. 23–25, Bucureşti, Republica Socialistă România comanda nr. 141

Scanned with OKEN Scanner